UNTERSUCHUNGEN ZUR SPIROSTANOL- UND SPIROSTANOLGLYKOSID-FÜHRUNG DER TOMATIDENOL-SIPPE VON SOLANUM DULCAMARA L

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ulrich Köthe
aus Schleusingen/Thür.

Düsseldorf 1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0035

UNTERSUCHUNGEN ZUR SPIROSTANOL- UND SPIROSTANOLGLYKOSID-FÜHRUNG DER TOMATIDENOL-SIPPE VON SOLANUM DULCAMARA L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ulrich Köthe

aus Schleusingen/Thür.

Düsseldorf

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan : Professor Dr. O. HESS

Referent : Professor Dr. G. WILLUHN

Korreferent : Professor Dr. G. WULFF

Tag der mündlichen Prüfung : 13. 6. 1980

Für meine Mutter,

Roswitha und Alexander

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Willuhn am Institut für Pharmakognosie der Universität Frankfurt/Main begonnen und am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf weitergeführt und beendet.

Meinem hochverehrten Lehrer und Doktorvater

Herrn Professor Dr. G. Willuhn

danke ich herzlich für die stets hilfreiche Betreuung, Unterstützung und Förderung meiner Arbeit sowie für die mir jederzeit entgegengebrachte Großzügigkeit!

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung und Problemstellung	1
B.	Zur Biosynthese der Spirostanole und Spirosolanole	7
I.	Spirostanole	7
II.	Spirosolanole	13
C.	Der Yamogeningehalt und seine Variabilität in den oberirdischen Organen der Tomatidenol - Sippe von Solanum dulcamara	18
I.	Herkunft der untersuchten Pflanzen und Zuordnung zur Tomatidenol - Sippe	18
II.	Isolierung und Identifizierung von Yamogenin	24
III.	Quantitative Bestimmung von Yamogenin in den oberirdischen Organen	26
	1. Methode	26
	2. Der Yamogeningehalt in Pflanzen verschiedener natürlicher Wuchsorte	27
	3. Der Yamogenin- und Tomatidenolgehalt der Blätter im Verlaufe der Vegetationsperiode	30
	4. Der Yamogenin- und Tomatidenolgehalt in Blättern unterschiedlicher Insertionshöhen	34
	5. Der Yamogenin- und Tomatidenolgehalt in der Handelsdroge "Stipites Dulcamarae"	35
IV.	Diskussion der Untersuchungsergebnisse zur Spirostanolführung	37
D.	Isolierung und Identifizierung der neutralen Steroidsaponine	44
I.	Gewinnung der Rohsaponin - Fraktion und DC - Nachweis der neutralen Steroidsaponine	44

Seite

II. Reinigung und Fraktionierung der Rohsaponin - Fraktion 47

III. Isolierung und Identifizierung des Furostanolglykosides A 48

1. Isolierung und Charakterisierung 48

2. Strukturermittlung des genuinen Aglykons 50

2.1. Umwandlung zum Spirostanolglykosid und Nachweis von Glucose 50

2.2. Identifizierung von Yamogenin und den Zuckerkomponenten an C-3 51

2.3. Oxidative Spaltung des Furostanolglykosides zum Δ^{16}- Allopregnenolonglykosid und γ-Methyl-δ-hydroxyvaleriansäureglucosid 56

IV. Isolierung und Identifizierung des Furostanolglykosides C 61

V. Identifizierung der Aglykon- und Zuckerkomponenten der Furostanolglykoside B, D, E und F 63

VI. Versuche zur Strukturaufklärung der Zuckerketten 66

1. Allgemeines zu den herangezogenen Methoden 66

1.1. Partielle Säurehydrolyse und enzymatische Hydrolyse 66

1.2. Methylierungsanalyse 66

1.2.1. Permethylierung und Hydrolyse 68

1.2.2. Reduktion und Acetylierung der Methylzucker 69

1.2.3. GC - und GC - MS - Analyse der Alditolacetate 69

2. Die Struktur des Tetrasaccharides am Furostanolglykosid A (= Solayamocinosid A) 73

Seite

2.1. Partialhydrolyse des Glykosides 73

2.2. GC - und GC - MS - Analyse der partiell methylierten Alditolacetate 74

3. Die Struktur des Trisaccharides am Furostanolglykosid C (= Solayamocinosid C) 84

VII. DC - Nachweis neutraler Steroidsaponine in Stengeln, Blüten und Früchten der Tomatidenol - Sippe von S. dulcamara 89

VIII. Diskussion der Ergebnisse 91

E. Zusammenfassung 97

F. Material und Methoden 102

I. Herkunft, Ernte, Trocknung und Lagerung des Untersuchungsmaterials 102

II. Bestimmung der Steroidalkaloid - Sippe 102

III. Spektroskopische Methoden 103

IV. Bestimmung physikalischer Konstanten 104

V. Chromatographische Methoden 104

1. Dünnschichtchromatographie 104

1.1. Analytische Dünnschichtchromatographie 104

1.2. Präparative Dünnschichtchromatographie 104

1.3. Dünnschichtchromatographische Trennsysteme und Detektionsverfahren 105

1.3.1. Neutrale Steroidsaponine 105

1.3.2. Basische Steroidsaponine 106

1.3.3. Basische und neutrale Aglyka 106

1.3.4. Zucker 107

2. Säulenchromatographie 107

3. Gaschromatographie 108

Seite

3.1. Gaschromatographie der Zucker 108

3.1.1. Oximsilylderivate 108

3.1.2. Alditolacetate 108

3.1.3. Partiell methylierte Alditolacetate 109

VI. Derivatisierungen 110

1. Acetylierung 110

2. Permethylierung der Steroidglykoside 110

2.1. Herstellung des Reagenzes 111

2.2. Permethylierung und Hydrolyse 111

3. Oximbildung und Silylierung der Zucker 112

4. Herstellung der Alditolacetate 112

VII. Isolierung von Yamogenin 113

VIII. Quantitative Bestimmung von Yamogenin 114

1. Photometrische Gehaltsbestimmung 114

1.1. Methode 114

1.2. Erstellung der Eichkurve 116

1.3. Bestimmung des methodischen Fehlers 118

2. Gaschromatographische Gehaltsbestimmung 119

IX. Quantitative Bestimmung von Tomatidenol 122

X. Isolierung der neutralen Steroidsaponine 124

1. Gewinnung der Rohsaponin - Fraktion 124

2. Reinigung der Rohsaponin - Fraktion am Ionenaustauscher sowie durch Ätherfällung 125

3. Säulenchromatographische Fraktionierung der Rohsaponin - Fraktion 125

4. Isolierung von Solayamocinosid A 126

5. Isolierung von Solayamocinosid C 127

6. Isolierung der Solayamocine B, D, E und F 128

Seite

6.1. Isolierung von Solayamocinosid B und Solayamocin B 128

6.2. Isolierung von Solayamocin D und E 128

6.3. Isolierung von Solayamocin F 129

XI. Oxidativer Abbau von Solayamocinosid A 129

1. Peracetylierung und Dehydratisierung 129

2. Chromsäure - Abbau 130

2.1. Hydrolyse des $\Delta^{5,16}$- Pregnadien-3β-ol-20-on-glykosides 130

2.2. Acetylierung des isolierten $\Delta^{5,16}$-Pregnadien-3β-ol-20-ons 132

2.3. γ-Methyl-δ-hydroxy-valeriansäureglucosid 132

XII. Hydrolytische Maßnahmen zur Strukturaufklärung der Zuckerkette von Solayamocinosid A 133

1. Abspaltung der Glucose von C-26 mit verdünnter Säure 133

2. Enzymatische Abspaltung der Glucose von C-26 133

3. Totalhydrolyse von Solayamocin A 134

4. Partialhydrolyse von Solayamocin A 135

5. Enzymatische Abspaltung der Galactose von Solayamocin A 135

6. Hydrolyse des permethylierten Solayamocin A 135

XIII. Nachweis der hämolytischen Aktivität 137

G. Literaturverzeichnis 138

A. Einleitung und Problemstellung

Der Bittersüße Nachtschatten, Solanum dulcamara L., ist ein kletternder Halbstrauch, der aus niederliegenden Rhizomen krautige Stengel treibt, die eine Länge von 2 - 3 m und einen Durchmesser von 2 - 5 mm erreichen können. Die Pflanze ist in den gemäßigten Klimazonen Europas und Asiens beheimatet und nach Nordamerika wahrscheinlich eingeschleppt worden (HEGI, 1927).

S. dulcamara zählt in der Volksmedizin zu den seit alters her bekannten Heilpflanzen, deren verholzte Stengel als Stipites Dulcamarae in das Ergänzungsbuch zum DAB 6 aufgenommen waren. Die aus Stipites Dulcamarae hergestellten Extrakte wurden früher vor allem zur Behandlung chronischer Hautleiden, besonders Ekzemen, chronischer Bronchitis sowie Asthma und Rheumatismus empfohlen (LINNÉ, 1749; SCHMIDT u. SALLER, 1952; SCHULZ, 1956; GESSNER u. ORZECHOWSKI, 1974). In der Volksmedizin waren die Bittersüßstengel weiterhin als "Blutreinigungsmittel" geschätzt, wobei hier besonders eine diuretische, eine stoffwechselstimulierende und eine antidyskratische Wirkung genannt werden (GESSNER u. ORZECHOWSKI, 1974; BRAUN, 1978). Heute wird der Bittersüße Nachtschatten praktisch nur noch in der Homöopathie gebraucht.

Es kann in diesem Zusammenhang als interessant vermerkt werden, daß bei den drei Hauptanwendungsgebieten für Stipites Dulcamarae, nämlich Rheumatismus, chronische Hautleiden und Asthma, heute nicht selten Verbindungen aus der Gruppe der

Glucocorticoide angewandt werden, d.h. Stoffe, die in ihrer chemischen Grundstruktur den in Solanum - Arten vorkommenden basischen und neutralen Steroidsaponinen ähnlich sind. Als Hauptwirkstoffe von S. dulcamara werden demzufolge auch diese basischen und neutralen Steroidsaponine angesehen (GESSNER u. ORZECHOWSKI, 1974; BRAUN, 1978). Eine Übersicht über Untersuchungen zur biologischen Aktivität dieser basischen Steroide findet sich bei SCHREIBER (1968). Für eine Reihe von Solanum - Steroidalkaloidglykosiden ist eine antibiotische Wirkung gegen Pilze und Bakterien sowie eine cytostatische Aktivität nachgewiesen worden. Das Steroidalkaloidglykosid ß-Solamarin aus S. dulcamara wirkt antitumoral (KUPCHAN und Mitarb., 1965; KUPCHAN, 1970). Des weiteren wurden u.a. auch antihistaminische und antiphlogistische Wirkungen bei steroiden Solanum - Alkaloiden nachgewiesen.

Die entsprechenden sauerstoffanalogen, neutralen Steroidsaponine, deren Vorkommen nicht auf die Gattung Solanum beschränkt ist, besitzen ebenfalls eine antiphlogistische und antiarthritische Wirkung, die qualitativ derjenigen von Betamethason entspricht, ohne jedoch dessen Wirkungsstärke zu erreichen (PARIKH und Mitarb., 1970; BHATTACHARYA und Mitarb., 1971; PANDEY und Mitarb., 1972; SINGH und Mitarb., 1972). Auch eine antimikrobielle Wirksamkeit gegen verschiedene Pilzstämme (TSCHESCHE u. WULFF, 1965) sowie eine cytotoxische Wirkung (RAVIKUMAR und Mitarb., 1979) ist bei neutralen Steroidsaponinen nachgewiesen worden.

Abgesehen von dem vielseitigen biologischen und pharmakolo-

gischen Wirkungsspektrum der basischen und neutralen Steroidsaponine besitzen beide Stoffgruppen als leicht zugängliches Material für die partialsynthetische Herstellung von therapeutisch verwendeten Steroidhormonen großes Interesse (SCHREIBER, 1968; BLUNDEN und Mitarb., 1975). Vor allem diese Eigenschaft löste eine systematische Suche nach hierfür geeigneten Vorkommen dieser Steroidkörper innerhalb der Gattung Solanum aus. Die zahlreichen Analysen ergaben, daß sich S. dulcamara von den bisher untersuchten über 400 Solanum - Arten durch eine stärkere chemische Differenzierung in der Steroidführung unterscheidet. Hinsichtlich des Vorkommens dieser Stoffe in den oberirdischen vegetativen Organen existieren von dieser Pflanze drei Chemovarianten, die sich durch den Gehalt von jeweils nur einem der drei folgenden Steroidalkaloide zumindest als Hauptkomponente auszeichnen: Tomatidenol (25S, Δ^5), Soladulcidin (25R, 5αH) und Solasodin (25R, Δ^5)(zur Chemie siehe SCHREIBER, 1968). Begleitet werden diese als Spirosolanole bezeichneten basischen Steroide von den konfigurativ entsprechenden sauerstoffanalogen Spirostanolen Yamogenin (25S, Δ^5), Tigogenin (25R, 5αH) und Diosgenin (25R, Δ^5)(BOLL, 1962; DERSCH u. SANDER, 1962; SCHREIBER u. RÖNSCH, 1965). In der Pflanze liegen diese Steroide ausschließlich in glykosidischer Bindung vor. Diese unterschiedliche Steroidalkaloidführung ist genetisch fixiert (WILLUHN, 1966a; RÖNSCH und Mitarb., 1968). Von den unreifen Früchten und den Wurzeln werden dagegen die Steroidalkaloide auch gemeinsam gebildet (SANDER u. WILLUHN, 1961; RÖNSCH u. SCHREIBER, 1966a; WILLUHN,

1967, 1968; WILLUHN u. KUN-ANAKE, 1970). Das Vorkommen dieser drei Chemovarianten ist dabei geographisch differenziert (SANDER, 1963a; MATHÉ u. MATHÉ, 1978): die Tomatidenol - Sippe hat ihr Hauptverbreitungsgebiet in Westeuropa, die Soladulcidin - Sippe dagegen in Osteuropa. Die Solasodin - Sippe tritt im Vergleich zu den beiden anderen Sippen in diesen Bezirken nur selten auf.

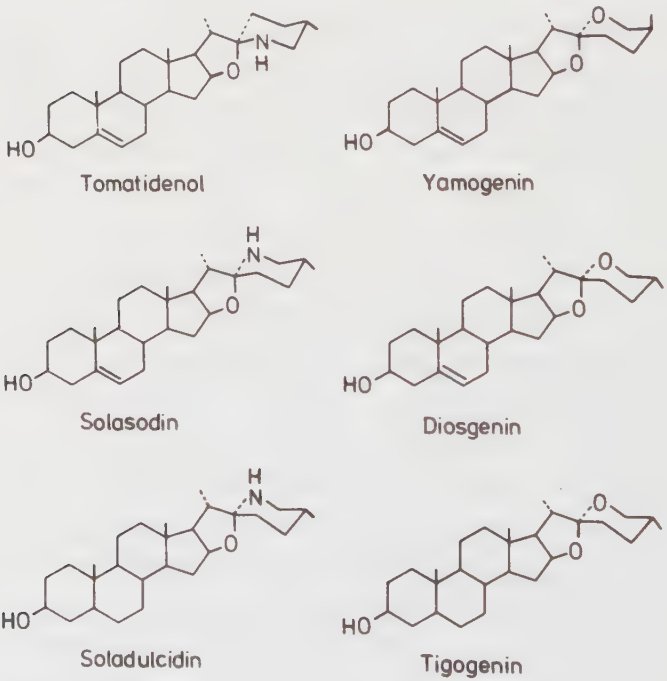


Abbildung 1: Die Spirosolanole und Spirostanole der oberirdischen Organe von Solanum dulcamara L.

Die umfangreiche Literatur über die Steroidführung von S. dulcamara ist kürzlich von MATHÉ u. MATHÉ (1978) zusammengefaßt worden. Hier liegt eine Reihe von Untersuchungen vor, die sich mit dem qualitativen und quantitativen Gehalt sowie der Variabilität der basischen Steroidaglyka beschäftigen (u.a. SANDER u. WILLUHN, 1961; MAKLEIT und Mitarb., 1962; MAKLEIT u. BOGNÁR, 1963; TOMOWA, 1962; SANDER, 1963b; BOGNÁR u. MAKLEIT, 1965; VAGUJFALVI und Mitarb., 1966; WILLUHN, 1967, 1968; VERBIST, 1971; MATHÉ u. MATHÉ, 197O, 1972, 1973, 1978; MATHÉ und Mitarb., 1977).

Auch sind die am häufigsten auftretenden basischen Steroidsaponine isoliert und ihre Zucker identifiziert worden (SCHREIBER, 1968; RASMUSSEN u. BOLL, 1958; ALKEMEYER, 1959; ALKEMEYER u. SANDER, 1959; BOLL, 1962; BOLL u. ANDERSEN, 1962; RÖNSCH u. SCHREIBER, 1966b; TUKALO u. IVANCHENKO, 1971). Für die sowohl als Wirkstoffe als auch als Ausgangsmaterial für die Partialsynthese von Steroidhormonen ebenso wichtigen biosynthetisch verwandten neutralen Steroidsaponine liegen im Vergleich dazu nur wenige qualitative Analysen vor. Quantitative Angaben über ihren Gehalt und dessen Variabilität stehen hier noch aus. Desgleichen fehlen Untersuchungen über die Anzahl und die Art der neutralen Saponine. Bisher ist es noch nicht gelungen, ein neutrales Steroidsaponin aus S. dulcamara zu isolieren und dessen Zucker zu identifizieren. Da die stets als Glykoside vorliegenden basischen und neutralen Steroidgerüste in Solanum - Arten auf einem weitgehend gemeinsamen Biosyntheseweg gebildet werden und nicht bekannt

ist, inwieweit hierbei einzelne Schritte in glykosidischer Bindung erfolgen, wäre ein Vergleich der Zuckerkettenstruktur dieser beiden biogenetisch verwandten Stoffgruppen interessant.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist deshalb:

1. die Analyse des quantitativen Spirostanolgehaltes und seine Variabilität in Solanum dulcamara L.;
2. die Bestimmung von Zahl und Art der neutralen Steroidsaponine in den oberirdischen Organen von S. dulcamara;
3. die Reindarstellung einzelner neutraler Steroidsaponine und die Identifizierung ihrer Zuckerkomponenten.

Die Untersuchungen beschränken sich dabei auf die am weitesten verbreitete Tomatidenol - Sippe von S. dulcamara, in der neben Tomatidenol das sauerstoffanaloge Spirostanol Yamogenin auftritt.

B. Zur Biosynthese der Spirostanole und Spirosolanole

Die neutralen und basischen Steroidsapogenine enthalten wie Cholesterol 27 C - Atome im Molekül (s. Abb. 1, S. 4). Es lag daher nahe anzunehmen, daß die Ringe E und F mit dem Spiroketal- bzw. dem Aza - Oxa - Spiran - System biogenetisch durch Cyclisierung der Cholesterol - Seitenkette entstehen. Dem stand entgegen, daß Cholesterol lange Zeit als ein typisches Zoosterol galt. Dieses Sterin hat sich jedoch inzwischen als ubiquitär auch im Pflanzenreich erwiesen (HEFTMANN, 1968, 1970; WILLUHN, 1976). Der Einbau von markiertem Cholesterol in die neutralen und basischen C 27 - Steroidsapogenine ist wiederholt nachgewiesen worden (BENNETT u. HEFTMANN, 1965; BENNETT und Mitarb., 1967; HEFTMANN und Mitarb., 1967; TSCHESCHE u. HULPKE, 1966a, 1966b). Ein Abbau der Seitenkette und ein Wiederaufbau des Spiroketalsystems, ähnlich wie bei den Herzglykosiden, konnte ausgeschlossen werden (JOLY u. TAMM, 1967).

I. Spirostanole

Bei der Bildung der Spirostanole aus Cholesterol muß dieses an C-16, C-22 und C-26 oxidiert werden. Steroide mit Sauerstoffunktionen in diesen Positionen sind gemeinsam mit Steroidsapogeninen in Pflanzen gefunden worden, z.B. 22-Hydroxycholesterol (STABURSVIK, 1953), Kryptogenin (BRIGGS und Mitarb., 1950) und Barogenin (KANEKO und Mitarb., 1977). Die Frage nach der Reihenfolge der Hydroxylierungsschritte in der

Seitenkette und im Ring D ist in den letzten Jahren Gegenstand mehrerer Untersuchungen verschiedener Arbeitskreise gewesen (TSCHESCHE und Mitarb., 1968a; BENNETT und Mitarb., 1970; TSCHESCHE u. FRITZ, 1970; CANONICA und Mitarb., 1972; TOMITA u. UOMORI, 1971). Danach konnte angenommen werden, daß als Hauptweg zunächst die Einführung einer Hydroxylgruppe an C-26 erfolgt. Mit dieser Reaktion fällt die Entscheidung für die Bildung von Spirostanolen der 25 R - oder 25 S - Reihe (z.B. Diosgenin oder Yamogenin), da es sich bei dieser Hydroxylierung um eine stereospezifische Oxidation handelt, bei der jeweils nur eine der beiden terminalen Methylgruppen an C-25 hydroxyliert wird, d.h. am C-25 liegt hierfür ein prochirales Zentrum vor (RONCHETTI und Mitarb., 1975; VARMA und Mitarb., 1969; JOLY und Mitarb., 1969b). Anschließend erfolgt die Einführung der Hydroxylgruppe an C-16 und zuletzt an C-22.

Da für die Bildung der Spirostanole auch 16ß-Hydroxycholesterol als Vorstufe herangezogen wird (TSCHESCHE u. LEINERT, 1973), kann die Hydroxylierung von Cholesterol primär auch an C-16 und erst anschließend an C-26 erfolgen. Bei der primären Hydroxylierung scheinen somit zwei Wege zu existieren, von denen zur Zeit nicht gesagt werden kann, welcher der bevorzugte ist. Sicher ist jedoch, daß die Einführung der Sauerstoffunktion an C-22 erst erfolgt, wenn die Hydroxylierung an C-16 und C-26 stattgefunden hat, da 22-Hydroxy- und 22-Ketocholesterol als Vorstufen der Spirostanole ausgeschlossen werden konnten (TSCHESCHE und Mitarb., 1968a).

Mit der bislang ungeklärten Einführung der Sauerstoffunktion an C-22 haben sich TSCHESCHE u. PIESTERT (1975) beschäftigt. Ausgehend von dem Befund, daß der Abbau der Seitenkette von Cholesterol zu Pregnenolon über das 20α-Hydroxyderivat erfolgt (CHAUDHURI und Mitarb., 1962; SHIMIZU und Mitarb., 1962), prüften die Autoren, ob dieses primäre Cholesterolderivat nicht auch zur Spirostanolbildung herangezogen werden kann. Da in entsprechenden Verfütterungsexperimenten 20α-Hydroxycholesterol tatsächlich in das Spirostanol Tigogenin eingebaut wurde, postulierten TSCHESCHE u. PIESTERT (1975), daß bei der Spirostanolbiosynthese eine 20α-Hydroxyverbindung durch Dehydratisierung zu einem $\Delta^{20(22)}$- Derivat als Zwischenstufe überführt wird (s. Abb. 2).

Aufgrund dieses Ergebnisses muß bei der Betrachtung der Hydroxylierungssequenz von Cholesterol auch der Zeitpunkt der Einführung der 20α-Hydroxygruppe neben der 16β- und 26-Hydroxygruppe berücksichtigt werden. Nach den vorliegenden Verfütterungsexperimenten ist hier eine bestimmte Reihenfolge nicht vorgegeben, sodaß mehrere Wege existieren können, von denen wahrscheinlich nur einer in der Pflanze den Hauptweg darstellt.

Ausgehend von dem $\Delta^{20(22)}$- Derivat kann es zur Bildung des Furanringes kommen. Ein solches Furostan-3β,26-diol (s. Abb. 2) stellt eine experimentell gesicherte Vorstufe in der Spirostanolbiosynthese dar (CANONICA und Mitarb., 1972). Da von einer Dioscorea - Art auch 16β,22,26-Trihydroxycholesterol in Diosgenin überführt wird (TOMITA u. UOMORI, 1971), könnte

die Bildung des Furanringes auch über eine derartige Zwischenstufe erfolgen. Diese könnte durch Anlagerung von Wasser an die $\Delta^{20(22)}$- Doppelbindung entstehen. Der Furanring würde dann durch Dehydratisierung der Hydroxylgruppe an C-22 gebildet werden (s. Abb. 2).

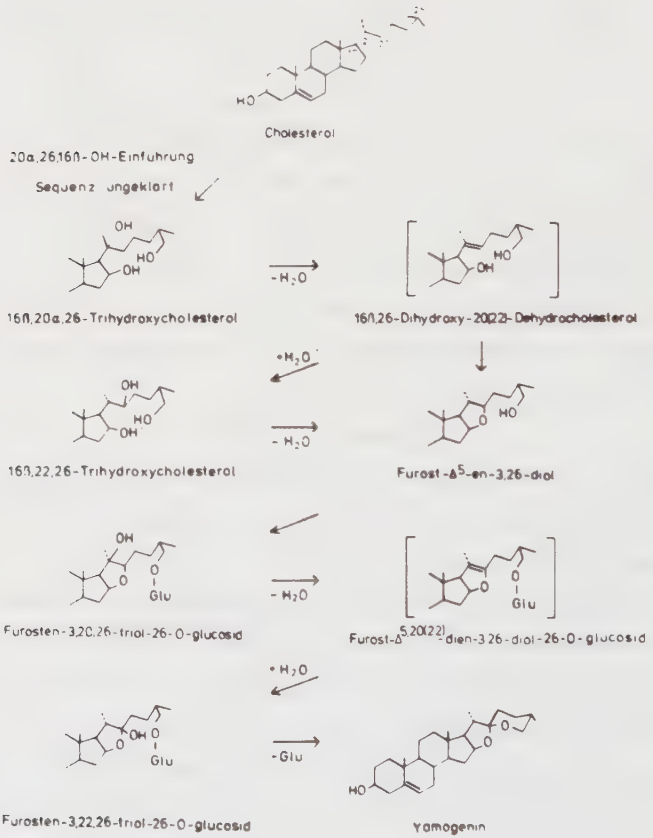


Abbildung 2: Schema der 25 S - Spirostanol - Biosynthese

Diese Ring E - geschlossenen, Ring F - offenen Furostan-3β-ole (bzw. Furost-Δ^5-en-3β-ole) sind als bisdesmosidische Glykoside in den letzten Jahren wiederholt im Pflanzenreich nachgewiesen worden (TSCHESCHE, 1966; TSCHESCHE und Mitarb., 1967, 1968b, 1969b, 1972, 1973, 1974a, 1974b; SATO u. SAKAMURA, 1973; KAWASAKI und Mitarb., 1974; DRAGALIN u. KINTYA, 1975; KAWANO und Mitarb., 1975, 1977; BOGACHEVA und Mitarb., 1976; KROKHMALYUK u. KINTYA, 1976a, 1976b; KINTYA und Mitarb., 1976; GORYANU und Mitarb., 1976; GORYANU u. KINTYA, 1976a, 1976b; KINTYA und Mitarb., 1976, 1978; MAHATO und Mitarb., 1978; TOMOWA u. GJULEMETOWA, 1978). Alle Furostanolglykoside besitzen neben der Zuckerkette am C-3-Hydroxyl ein an der C-26-Hydroxylgruppe β-glykosidisch gebundenes D-Glucosemolekül. Abbildung 3 zeigt als Vertreter dieser Stoffgruppe die von SATO u. SAKAMURA (1973) aus Tomatensamen isolierte Substanz TFI. Am C-22 tragen diese Furostanolglykoside in der Regel eine freie Hydroxylgruppe.

Die Einführung dieser Hydroxylgruppe an C-22 erfolgt wahrscheinlich über eine erneute Hydroxylierung an C-20 und Dehydratisierung zu einem $\Delta^{20(22)}$- Furostenderivat sowie anschließende Hydratisierung dieser Doppelbindung (s. Abb. 2). Hierfür spricht die Isolierung eines Δ^5- Furosten-3β,20,26-triols aus einer Trillium - Art (MARKER und Mitarb., 1943). Dabei sollte die Glucosidierung an C-26 bereits vor Bildung des $\Delta^{20(22)}$- Derivates erfolgt sein, weil sich anderenfalls im sauren Milieu sofort ein Gleichgewicht zwischen diesem cyclischen Enoläther und dem Spiroketal einstellen würde.

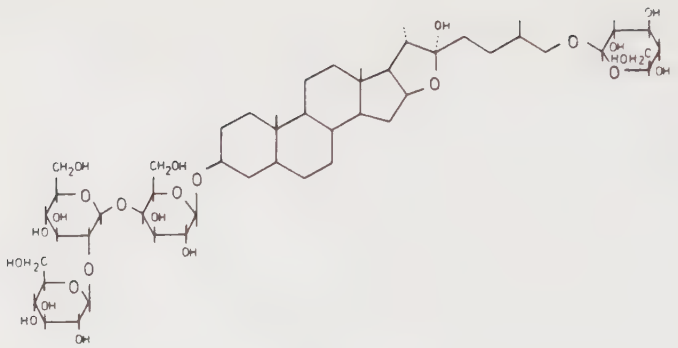


Abbildung 3: Struktur von TFI, einem Furostanolglykosid aus Lycopersicum esculentum (SATO u. SAKAMURA, 1973)

In der frischen Pflanze herrschen in der Regel die an C-22 hydroxylierten bisdesmosidischen Furostanolglykoside vor (KIYOSAWA und Mitarb., 1968). Wird die Glucose an C-26 abgespalten – was enzymatisch, aber auch bereits mit verdünnten Säuren erfolgen kann und u.a. in Blatthomogenisaten von Dioscorea floribunda nachgewiesen worden ist (JOLY und Mitarb., 1969a) – dann schließt sich spontan der Ring F unter Bildung des entsprechenden Spirostanolglykosides. Für die Benennung der deshalb als biogenetische Vorstufe anzusehenden Furostanolglykoside schlagen japanische Autoren (z.B. KIYOSAWA und Mitarb., 1968) daher die Vorsilbe Proto- vor den Namen des entsprechenden monodesmosidischen Spirostanolglykosides vor, während TSCHESCHE und Mitarb. (1969a) zur Bezeichnung dieses neuartigen Strukturtyps die Endung -osid vorgeschlagen haben.

II. Spirosolanole

Unsere gegenwärtigen Kenntnisse über die Biogenese des Aza - Oxa - Spiran - Systems der Spirosolanole haben TSCHESCHE u. SPINDLER (1978) in einer neueren Arbeit zusammengefaßt (s. Abb. 4; vgl. auch WILLUHN, 1976). Die bisherigen Ergebnisse zur Spirosolanolbiogenese sprechen dafür, daß die Funktionalisierung der Seitenkette des Cholesterols hier mit der Einführung einer Hydroxylgruppe an C-26 beginnt, da die daraus resultierenden 25R- bzw. 25S-Hydroxycholestanole jeweils stereospezifisch zu Soladulcidin (TSCHESCHE und Mitarb., 1976) bzw. Tomatidin (RONCHETTI und Mitarb., 1975) umgewandelt werden, 16β-Hydroxycholestanol (TSCHESCHE u. LEINERT, 1973), 22-Ketocholestanol (TSCHESCHE und Mitarb., 1968a) sowie 16β-Hydroxy-22-Ketocholestanol (TÖPFER, 1975) dagegen nicht metabolisiert werden. An diesen Schritt schließt sich als Hauptweg direkt die Einführung des Stickstoffs an (TSCHESCHE u. FRITZ, 1970; TSCHESCHE u. LEINERT, 1973; RONCHETTI und Mitarb., 1975; TSCHESCHE und Mitarb., 1976). Als Stickstoffquelle wurde bei Veratrum grandiflorum L-Arginin nachgewiesen (KANEKO und Mitarb., 1976). Da auch hier 20α-Hydroxycholestanol zur Spirosolanolbildung herangezogen wird, kann für die Einführung der Hydroxylgruppe an C-22, die die Grundlage für die Bildung des Aza - Oxa - Spiran - Systems darstellt, der gleiche Mechanismus wie bei der Biosynthese der Spirostanole angenommen werden (TSCHESCHE u. PIESTERT, 1975). Während jedoch bei den Spirostanolen wegen der Blockierung der 26-Hydroxy - Funktion durch Glucose zunächst der Ring E zum Furostanol - Derivat

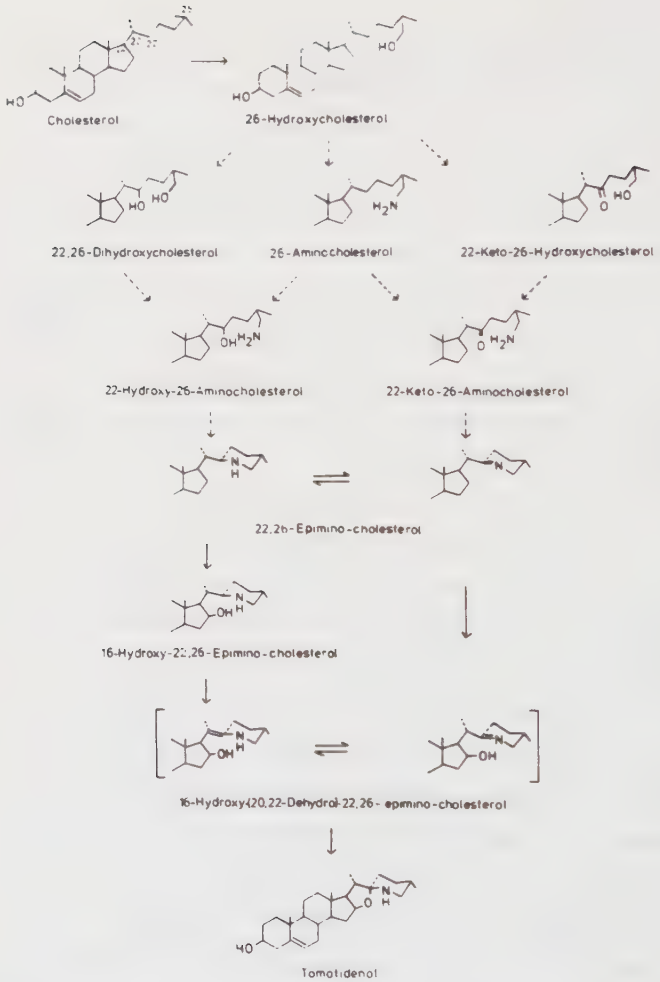
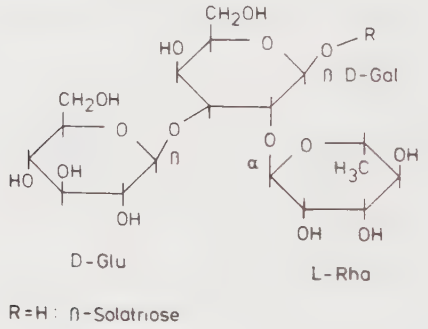


Abbildung 4: Schema der Spirosolanol - Biogenese nach TSCHESCHE u. SPINDLER (1978)

geschlossen wird (CANONICA und Mitarb., 1972) und teilweise erst bei der Hydrolyse in vitro die eigentlichen Spirostanole entstehen (TSCHESCHE u. WULFF, 1973), tritt bei den Spirosolanolen als Hauptweg zuerst die Cyclisierung von Ring F ein (TSCHESCHE u. SPINDLER, 1978). Entsprechende 22,26-Epiminocholestan - Verbindungen sind verschiedentlich gefunden worden (ADAM und Mitarb., 1967, 1979; SATO und Mitarb., 1969; KHASHIMOV und Mitarb., 1970; USUBILLAGA und Mitarb., 1970; ABAIDULLAEV und Mitarb., 1974; KANEKO und Mitarb., 1975; BIRD und Mitarb., 1979). Bei all diesen Verbindungen befindet sich die C-27 - Methylgruppe in äquatorialer Position. Das läßt darauf schließen, daß die primäre Ring F - Cyclisierung, die schon SCHREIBER (1968) postulierte, in der Weise erfolgt, daß die C-27 - Methylgruppe stets in die energieärmere äquatoriale Position orientiert wird und erst anschließend die Cyclisierung von Ring E unter Bildung des Aza - Oxa - Spiran - Systems eintritt. Dabei erfolgt die Einführung der 16β-Hydroxygruppe erst unmittelbar vor der Cyclisierung zum Spirosolansystem (TSCHESCHE u. SPINDLER, 1978).

Die Spirosolanole liegen in der Pflanze ausschließlich als Glykoside vor. Die bisher bekannten Spirosolanolglykoside von S. dulcamara sind in Tabelle 1 aufgeführt. Als Zuckerbausteine wurden hier allgemein Glucose, Galactose und Rhamnose sowie auch Xylose und Arabinose gefunden. Von den Tomatidenolglykosiden α-, β- und γ-Solamarin sowie γ_1- und δ-Solamarin ist die Zuckerverknüpfung durch BOLL (1962) bzw. RÖNSCH u. SCHREIBER (1966b) aufgeklärt worden. Danach handelt es

sich bei dem Zucker von α-Solamarin um die Solatriose, bei β-Solamarin um die Chacotriose (s. Abb. 5) und bei γ-Solamarin um Chacobiose; die Zucker von γ_1- und δ-Solamarin lassen sich von Chacotriose bzw. Solatriose durch die Abspaltung von L-Rhamnose ableiten.



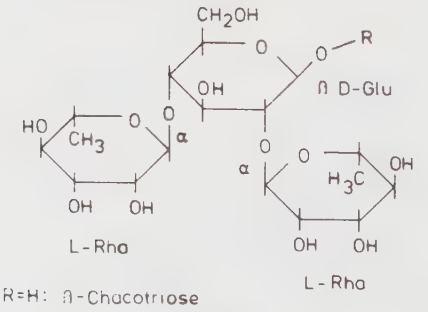


Abbildung 5: Solatriose und Chacotriose, die Zucker der Tomatidenolglykoside α- und β-Solamarin

Tabelle 1: Bisher bekannte Spirosolanolglykoside von S. dulcamara (zur Literatur siehe SCHREIBER, 1968)

Genin	Glykosid	Zucker	Verknüpfung
Tomatidenol	α-Solamarin	D-Gal, D-Glu L-Rha	Solatriose (s. Abb. 5)
	β-Solamarin	D-Glu, 2 L-Rha	Chacotriose (s. Abb. 5)
	γ-Solamarin	D-Glu, L-Rha	Chacobiose Rha-(1$^{\alpha}_{4}$)-Glu
	γ_1-Solamarin	D-Glu, L-Rha	Rha-(1$^{\alpha}_{2}$)-Glu
	δ-Solamarin	D-Gal, D-Glu	Glu-(1$^{\beta}_{3}$)-Gal
	Soladulcamarin*	L-Ara, D-Glu 2 L-Rha	
Soladulcidin	α-,β-,γ-Soladulcine	D-Gal, D-Glu L-Rha, D-Xyl	
	Soladulcidintetraosid	D-Gal, 2 D-Glu D-Xyl	
Solasodin	Solasonin	D-Gal, D-Glu L-Rha	Solatriose
	Solamargin	D-Glu, 2 L-Rha	Chacotriose

* Das Glykosid Soladulcamarin erwies sich als nicht einheitlich (BOLL, 1962).

C. Der Yamogeningehalt und seine Variabilität in den oberirdischen Organen der Tomatidenol - Sippe von Solanum dulcamara

I. Herkunft der untersuchten Pflanzen und Zuordnung zur Tomatidenol - Sippe

Yamogenin ist aus dem Kraut von S. dulcamara erstmals von SCHREIBER u. RÖNSCH (1960) isoliert worden. Weitere Untersuchungen ergaben, daß dieses Sauerstoffanaloge von Tomatidenol nur von Pflanzen der Tomatidenol - Sippe gebildet wird (BOLL, 1962; DERSCH u. SANDER, 1962; SCHREIBER u. RÖNSCH, 1963a, 1963b, 1965; SANDER, 1963a). Aus unreifen und reifen Früchten ist Yamogenin von DERSCH u. SANDER (1962) sowie SANDER (1963b) isoliert worden.

Für die vorliegende Untersuchung wurden S. dulcamara - Pflanzen von natürlichen Wuchsorten aus dem geographischen Verbreitungsgebiet der Tomatidenol - Sippe gesammelt (s. Tab. 2). Während die Pflanzen der Herkünfte 3 - 10 bisher noch nicht auf ihren Steroidgehalt untersucht worden sind, sollten die Pflanzen von den natürlichen Wuchsorten 1 und 2 nach Untersuchungen von KÖSTENS (1973) zur Tomatidenol - Sippe gehören. Die Analyse dieser Pflanzen lag jedoch so weit zurück, daß für die vorliegende Arbeit eine erneute Bestimmung der chemischen Sippen angeraten erschien.

Eine Unterscheidung der drei chemischen Sippen von S. dulcamara ist dünnschichtchromatographisch (dc) bereits aufgrund der unterschiedlichen Steroidalkaloidglykoside möglich. Dazu

Tabelle 2: Herkunft und Sippenzugehörigkeit der analysierten S. dulcamara - Pflanzen

Nr.	natürlicher Wuchsort	Trocken-gew. [g]	Steroidsapogenin	
			basisch	neutral
1	Schweinsberger Moor b. Marburg	6340	Tomatidenol	Yamogenin
2	Steinmühle Cappel b. Mbg.	72	Tomatidenol	Yamogenin
3	Lahnufer bei Gießen	63	Tomatidenol	Yamogenin
4	Wegrand Himmelgeist b. D'dorf	531	Tomatidenol	Yamogenin
5	Düsseldorf Oertelstr.	42	Tomatidenol	Yamogenin
6	Rheinufer b. Leverkusen	22	Tomatidenol	Yamogenin
7	Edersee, Bringhausen	154	Tomatidenol	Yamogenin
8	Büdingen, Stadtmauer	131	Tomatidenol	Yamogenin
9	Glandorf b. Münster	36	Tomatidenol	Yamogenin
10	Oberstdorf, Skischanze	25	Tomatidenol	Yamogenin

wurden die basischen Steroidglykoside aus dem wässrigen Methanolauszug der Blätter durch konz. Ammoniaklösung ausgefällt und in dem von BOLL (1962) angegebenen System Äthylacetat/Pyridin/Wasser (3v/1v/3v, Epiphase) auf Kieselgelschichten aufgetrennt. Zum direkten Vergleich wurden die authentischen Tomatidenol-, Solasodin- und Soladulcidinglykoside sowie auf demselben Weg gewonnene Steroidalkaloidglykoside aus bereits analysierten und auf dem Versuchsfeld kultivierten Klonen der Tomatidenol-, Solasodin- und Soladulcidin - Sippe (DQ_1, DFR bzw. DW_3; s. KÖSTENS, 1973 bzw. WILLUHN, 1966a, 1966b) mitchromatographiert. Nach dieser DC - Analyse sind die Pflanzen der Standorte 1 - 10 alle der Tomatidenol - Sippe zuzuordnen (s. Abb. 6A).

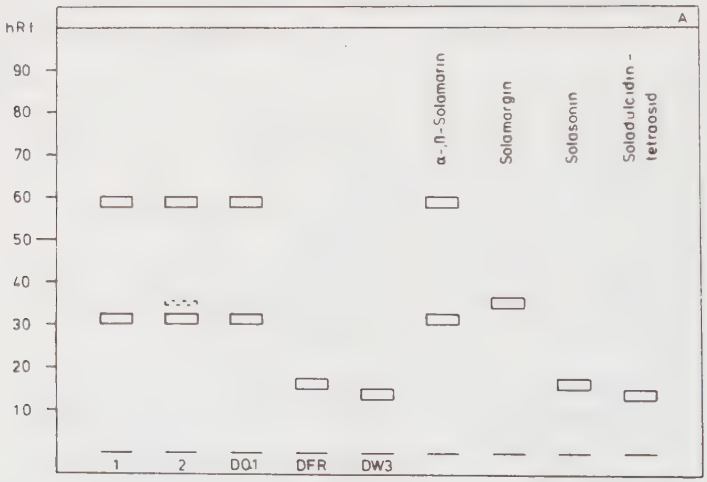


Abbildung 6A: DC der Spirosolanol - Glykoside aus S. dulcamara - Pflanzen verschiedener Herkünfte
1 u. 2 = natürliche Wuchsorte (s.Tab.2); DQ_1, DFR, DW_3 = Klonpflanzen der Tomatidenol-, Solasodin- und Soladulcidin - Sippe; System: Äthylacetat/Pyridin/Wasser (3v/1v/3v, Epiphase); Detektion: DRAGENDORFF'S Reagenz bzw. Anisaldehyd/H_2SO_4

Mit DRAGENDORFF'S Reagenz und mit Anisaldehyd/H_2SO_4 ließen sich jeweils die Tomatidenolglykoside α- und β-Solamarin nachweisen. In Pflanzen der Herkünfte 2, 3, 4 und 7 ist daneben das spurenweise Vorkommen des Solasodinglykosides Solamargin nicht auszuschließen.

Zur weiteren Identifizierung wurden die basischen Steroidglykoside salzsauer hydrolysiert und die Aglyka mit Hilfe von Vergleichssubstanzen dc im System n-Hexan/Aceton (8v/2v) nach JAIN (1976) identifiziert. Hier ließ sich bei den untersuchten Herkünften jeweils nur Tomatidenol nachweisen (s. Abb. 6B).

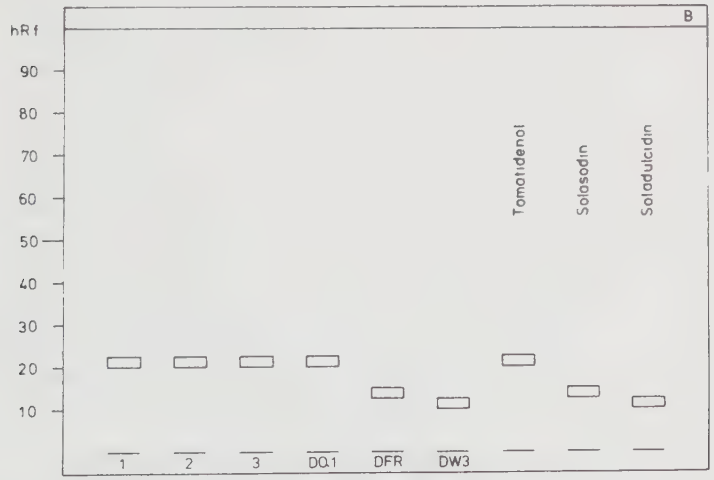


Abbildung 6B: DC der Spirosolanol - Aglyka aus S. dulcamara - Pflanzen verschiedener Herkünfte
1 - 3 = natürliche Wuchsorte (s.Tab.2); DQ_1, DFR, DW_3 = Klonpflanzen der Tomatidenol-, Solasodin- und Soladulcidin - Sippe;
System: n-Hexan/Aceton (8v/2v);
Detektion: DRAGENDORFF'S Reagenz bzw. Anisaldehyd/H_2SO_4

Die Überprüfung der alten Angaben über die bereits untersuchten Pflanzen der natürlichen Wuchsorte 1 und 2 sowie der seit Jahren kultivierten Klonpflanzen der drei chemischen Sippen zeigt somit, daß sich diese Pflanzen hinsichtlich ihrer Steroidalkaloidführung nicht verändert haben. Die Identifizierung der S. dulcamara - Pflanzen von den erstmals analysierten Wuchsorten als Tomatidenol - Pflanzen bestätigt die Aussage von SANDER (1963a), daß die chemisch differenzierten Sippen von S. dulcamara getrennte geographische Verbreitungsgebiete haben (vgl. auch MATHÉ u. MATHÉ, 1970).
Aufgrund der Zuordnung der eingesammelten Pflanzen zur Tomatidenol - Sippe sollten sie außer Tomatidenol das sauerstoffanaloge Yamogenin führen. Dieses konnte dc in den Blättern und Stengeln sowie in den Blüten und Früchten aller untersuchten Herkünfte nachgewiesen werden. Dazu wurden die getrockneten und voneinander getrennten Pflanzenteile mit Methanol erschöpfend extrahiert und der Extrakt mit 2n methanolischer Salzsäure vier Std. lang am Rückfluß hydrolysiert. Nach Neutralisation mit Natronlauge und intensivem Ausschütteln mit Chloroform erfolgte die dc Analyse des Chloroformrückstandes im System n-Hexan/Aceton (8v/2v) an Kieselgelschichten (JAIN, 1976) sowie an Silbernitrat-imprägniertem Kieselgel mit Chloroform/Äther/Essigsäure (97v/2,5v/0,5v) als Fließmittel (RÖNSCH u. SCHREIBER, 1967; DAWIDAR und Mitarb., 1973). Silbernitrat enthaltende Sorptionsmittel werden häufig zur Trennung von Verbindungen mit unterschiedlicher Zahl bzw. Stellung von Doppelbindungen angewendet, wobei die Komplexbildungstendenz zwischen Silber-

ionen und Doppelbindungen ausgenutzt wird (s. u.a. BARRETT und Mitarb., 1962; GUPTA u. DEV, 1963; LINDGREN u. SVAHN, 1966; BENNETT und Mitarb., 1966).

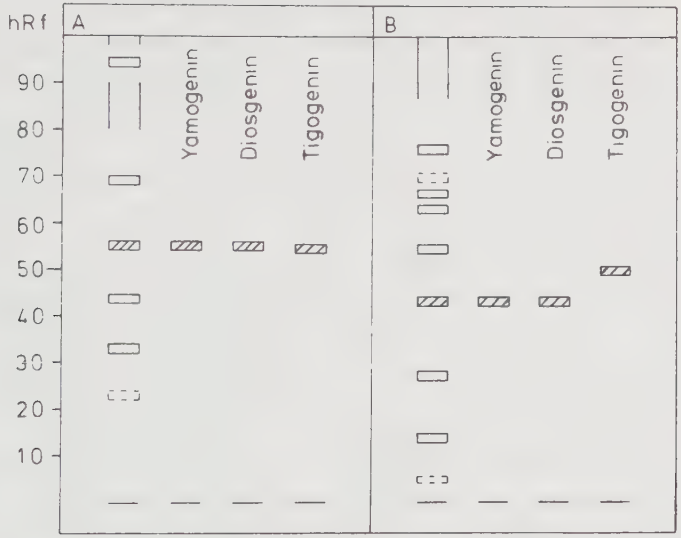


Abbildung 7: DC der Spirostanol - Aglyka am Beispiel der Blätter des Wuchsortes "Schweinsberger Moor" (Nr.1, Tab.2)
System A: n-Hexan/Aceton (8v/2v); System B: Schicht: Kieselgel + 8 % $AgNO_3$, Fließmittel: Chloroform/Äther/Essigsäure (97v/2,5v/0,5v); Detektion: Anisaldehyd/H_2SO_4

Die DC - Analyse in diesen Systemen ergab, daß alle oberirdischen Organe der Pflanzen von den 10 untersuchten Herkünften das Δ^5- ungesättigte Yamogenin führen. Abbildung 7 zeigt die DC - Trennung am Beispiel der Blätter der Herkunft "Schweinsberger Moor". Das gleichzeitige Vorkommen des 5α-gesättigten

Spirostanols Tigogenin kann danach ausgeschlossen werden (s. Abb. 7B). Diosgenin läßt sich kaum von Yamogenin differenzieren (Trennung der Acetate ist möglich; vgl. TSCHESCHE und Mitarb., 1962). Bisher ist aber das 25 R - Isomere Diosgenin noch niemals in Pflanzen der Tomatidenol - Sippe gefunden worden, sodaß es sich auch hier nur um Yamogenin handeln sollte. Eine Isolierung und weitere Identifizierung des dc nachgewiesenen Yamogenin wurde bei den Blättern des natürlichen Wuchsortes "Schweinsberger Moor" vorgenommen.

II. Isolierung und Identifizierung von Yamogenin

Zur Isolierung der Spirostanol - Aglyka aus den Blättern des Wuchsortes "Schweinsberger Moor" wurden diese mit Methanol erschöpfend extrahiert und der Methanolextrakt mit 2n methanolischer Salzsäure vier Stunden lang am Rückfluß hydrolysiert. Nach Neutralisation und intensivem Ausschütteln mit Chloroform resultierte ein zäher, brauner Rückstand, der an einer Aluminiumoxid - Säule mit Petroläther/Äther - Gemischen chromatographiert wurde. Die das Spirostanol enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und daraus durch präparative DC das Aglykon dc-rein isoliert (s. Exp. Teil, S. 113). Nach Umkristallisation aus Aceton schmolz das weiße, aus langen Nadeln bestehende Kristallisat bei 185 - 188°C und zeigte eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = -127,8^\circ$. Diese Werte stimmten mit Literaturwerten von Yamogenin überein (s. Tab. 3). Der Mischschmelzpunkt mit Yamogenin ergab keine Depression. Zur weiteren Identifizierung wurde das Acetylderivat hergestellt, dessen Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und spezifische Drehung den Angaben für Yamogenin-

acetat entsprachen (s. Tab. 3).

Tabelle 3: Physikalische Konstanten von Diosgenin, Yamogenin und ihren Acetaten

Substanz	Genin		Acetat	
	Schmp. °C	$[\alpha]_D^{20}$	Schmp. °C	$[\alpha]_D^{20}$
Isolierte Substanz	185 - 188	- 127,8	181	- 118,3
Yamogenin	187 - 188[1]	- 129[2]	182[2]	- 119[2]
Diosgenin	208 - 209[1]	- 129[2]	199 - 202[2]	- 121[2]

1) JEFFERIES u. HARDMAN (1972)

2) TSCHESCHE u. WULFF (1973)

Das IR - Spektrum der isolierten Substanz war identisch mit dem von Yamogenin (s. Abb. 8). Das gleichzeitige Auftreten des 25 R - Isomeren Diosgenin konnte aufgrund der Bandenstärke bei 900 und 920 cm^{-1} ausgeschlossen werden (WALL und Mitarb., 1955; JEFFERIES u. HARDMAN, 1972).

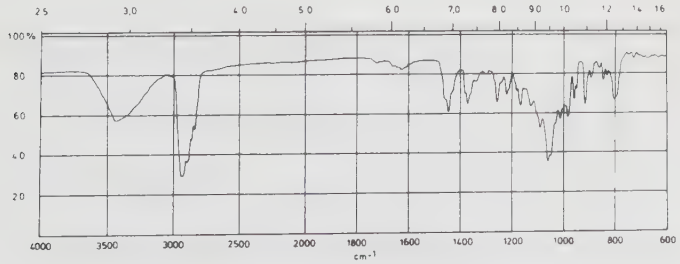


Abbildung 8: IR - Spektrum von Yamogenin

Das relative quantitative Verhältnis dieser IR - Banden gibt gut reproduzierbar die Zusammensetzung von Diosgenin - Yamogenin - Mischungen wieder. Bei reinem Diosgenin ist die Bande bei 900 cm^{-1} 6,3 mal höher als diejenige bei 920 cm^{-1}. Bei reinem Yamogenin ist umgekehrt die Bande bei 920 cm^{-1} um den Faktor 2,3 höher als diejenige bei 900 cm^{-1} (JEFFERIES u. HARDMAN, 1972). Das IR - Spektrum der isolierten Substanz wies einen 920/900 - Quotienten von 3,1 auf, sodaß hier reines Yamogenin vorliegen muß.

III. Quantitative Bestimmung von Yamogenin in den oberirdischen Organen

1. Methode

Die quantitative Yamogeninbestimmung erfolgte spektralphotometrisch unter Anwendung der Farbreaktion mit Antimon(III)-chlorid in Perchlorsäure. Dieses Reagenz ist bereits 1974 zur Gehaltsbestimmung der Δ^5- ungesättigten Steroidsapogenine Diosgenin und Yamogenin in pflanzlichen Rohextrakten von SOFOWORA u. HARDMAN eingeführt worden.

Die quantitative Extraktion der Yamogeninglykoside aus dem bei 50°C getrockneten Pflanzenmaterial erfolgte mit Methanol. Der 1g Droge entsprechende Methanolextrakt wurde hydrolysiert, neutralisiert und quantitativ in Chloroform geschüttelt. Nach dem Einstellen der Chloroformphase auf 20,00 ml wurden jeweils 200 µl dieser Lösung an DC - Alufolien (Kieselgel) mit n-Hexan/Aceton (8v/2v) chromatographiert und die herausgeschnittene Yamogenin - Zone mit dem Desaga - Elutor (DIBBERN und Mitarb.,

1971) mit Chloroform/Methanol (8v/2v) eluiert. Der Rückstand des Eluats wurde mit 5,0 ml Reagenz versetzt, die auftretende gelbrote Färbung nach 10 Min. gegen das Reagenz bei 498 nm vermessen und der Yamogeningehalt einer vorher erstellten Eichkurve entnommen (s. Exp. Teil, S. 118). Durch Zugabe von isolierter Yamogenin - Reinsubstanz zum Methanolextrakt wurde die Fehlergrenze dieser Methode mit 3,3 % ermittelt.
Da die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit bei dieser Farbreaktion kein konstantes Meßplateau zeigt (s. Exp. Teil, S. 115), wurde der Yamogeningehalt bei einem Teil der Analysen zusätzlich gaschromatographisch (gc) ermittelt. In Anlehnung an die Bestimmungsmethode nach ROZANSKI (1972) wurde hier der nach der präparativen DC erhaltene Rückstand in Xylol gelöst, mit 5α-Cholestan-3β-ol als innerem Standard versetzt und an einer SE 30 - Säule aufgetrennt. Die Bestimmung des Yamogeningehaltes erfolgte durch Korrelierung der Peakflächen von Cholestanol und Yamogenin in Analysen- und Standardchromatogramm (s. Exp. Teil, S. 120). Beide Methoden führten zu gut übereinstimmenden Ergebnissen (s. Tab. 13, Exp. Teil S. 121).

2. Der Yamogeningehalt in Pflanzen verschiedener natürlicher Wuchsorte

Da der Gehalt an Sekundärstoffen in Pflanzen verschieden sein kann, wurden in den Jahren 1977 und 1978 Pflanzen der Tomatidenol - Sippe von mehreren natürlichen Wuchsorten eingesammelt und der Yamogeningehalt der einjährigen Stengel, der Blätter, der Blüten sowie der Früchte unter-

schiedlicher Entwicklungsstadien getrennt bestimmt. Das Einsammeln der Pflanzen erfolgte dabei in der Zeit von Juni bis August, in der die Pflanzen sowohl blühten als auch gleichzeitig unreife, grüne und reife, rote Beeren trugen. Die ermittelten Yamogeningehalte sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Der Yamogeningehalt der oberirdischen Organe von S. dulcamara verschiedener natürlicher Wuchsorte (s. auch Tab. 2, S. 19) in % vom Trockengewicht

NATÜRLICHER WUCHSORT	ERNTEDATUM	STENGEL	BLÄTTER	BLÜTEN	FRÜCHTE GRÜN	FRÜCHTE GELB	FRÜCHTE ROT
SCHWEINSBERG	2.7.77	0,28	0,43	0,96	0,32	0,35	0,36
HIMMELGEIST	16.7.77	0,26	0,62	1,05	0,33	0,35	0,37
BRINGHAUSEN	9.8.77	0,34	0,36	0,13	0,07	0,45	0,48
BÜDINGEN	29.8.77	0,38	0,62	0,15	0,12	0,17	0,21
GLANDORF	23.6.78	0,73	0,64	0,58	0,50	0,54	0,61
LEVERKUSEN	1.7.78	0,73	0,53	0,42	0,68	0,70	0,75
CAPPEL/MBG.	12.7.78	0,60	0,40	0,87	0,13	0,51	0,54
GIESSEN	12.7.78	0,64	0,57	0,32	0,68	0,70	0,74
OBERSTDORF	12.7.78	0,41	0,68	0,48	N.B.	N.B.	N.B.
DÜSSELDORF	17.7.78	0,37	0,62	1,12	0,23	0,25	0,26

Der Yamogeningehalt der verschiedenen Organe wies bei den einzelnen Herkünften eine beträchtliche Variabilität auf, wie dies bereits von den stickstoffanalogen Steroidalkaloiden der Pflanze bekannt ist (MATHÉ u. MATHÉ, 1970). In den Blättern

der 10 untersuchten Wildstandorte lag der Yamogeningehalt zwischen 0,36 und 0,68 % bezogen auf das Trockengewicht. Einen ähnlich hohen Gehalt wiesen mit 0,26 - 0,73 % die einjährigen Stengel auf. In den grünen Früchten lag der Yamogeningehalt mit 0,07 - 0,68 % im allgemeinen niedriger als in den vegetativen oberirdischen Organen. Die gelben und roten, reifen Früchte wiesen durchgehend einen etwas höheren Yamogeningehalt als die unreifen Früchte auf. Die höchsten Spirostanolgehalte, aber auch die höchste Variabilitätsbreite in den Gehalten, wurden bei den Blüten der verschiedenen Wuchsorte gefunden. Die Gehalte lagen für dieses Organ zwischen 0,13 und 1,12 %. Auffallend ist, daß die beiden extrem niedrigen Werte von 0,13 bzw. 0,15 % bei Blüten gefunden wurden, die im August, d.h. gegen Ende der Blütezeit dieser Art, geerntet wurden. Die Abbildung 9 zeigt die Durchschnittswerte des Yamogeningehaltes der oberirdischen Organe, die aus den Analysen der verschiedenen Standorte gemittelt wurden. Danach ist bei den einjährigen Stengeln zur Blütezeit ein mittlerer Yamogeningehalt von 0,47 % und bei den Blättern von 0,55 % zu erwarten. Die Differenz zwischen diesen beiden Mittelwerten ist statistisch nicht signifikant. Die Blüten weisen einen durchschnittlichen Spirostanolgehalt von 0,61 % und die Früchte je nach Reifegrad einen Gehalt von 0,31 - 0,43 % auf. Der gefundene Anstieg des Yamogeningehaltes während der Fruchtreife findet mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95 % statt.

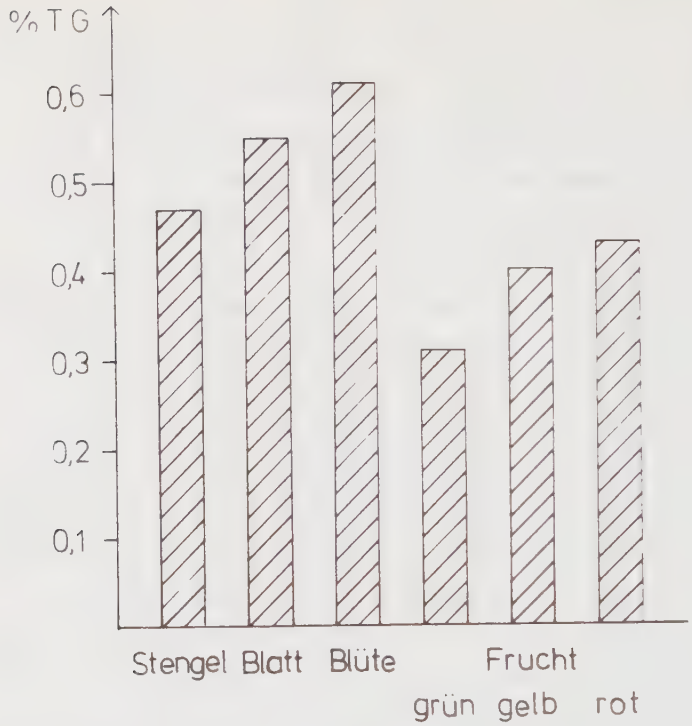


Abbildung 9: Der mittlere Yamogeningehalt der oberirdischen Organe von S. dulcamara - Pflanzen aus 10 verschiedenen Herkünften in % vom Trockengewicht

3. Der Yamogenin- und Tomatidenolgehalt der Blätter im Verlaufe der Vegetationsperiode

Die in den Blättern verschiedener Herkünfte gefundenen unterschiedlichen Yamogeningehalte können z.T. auch eine ontogenetisch bedingte Variabilität widerspiegeln, da zwischen dem ersten und dem letzten Erntezeitpunkt mehr als zwei Monate

lagen. Um eventuell auftretende Gehaltsänderungen im Verlaufe einer Vegetationsperiode zu erfassen, wurde von einer Pflanze des natürlichen Wuchsortes "Schweinsberger Moor" auf dem Versuchsfeld in Düsseldorf ein Klon angebaut und von diesen Klonpflanzen in etwa monatlichen Abständen unter Beachtung des jeweiligen Entwicklungszustandes der Pflanzen Blätter geerntet. Bei der ersten Ernte im Monat Mai, d.h. vor Blühbeginn, wiesen die Blätter einen Yamogeningehalt von 0,04 % auf. Zum zweiten Erntezeitpunkt im Juni blühten die Pflanzen; der Yamogeningehalt betrug zu diesem Entwicklungszeitpunkt 0,37 %. Im Juli, als die Pflanzen bereits fruchteten, aber auch weiterhin blühten, betrug der Yamogeningehalt der Blätter 0,47 %. Dieser Gehalt blieb auch in den Monaten September und Oktober, d.h. bis zum Ende der Vegetationsperiode, erhalten (s. Abb. 10, S. 33).

Es ist nun interessant, den Gehaltsverlauf von Yamogenin in der Vegetationsperiode mit dem Gehalt des daneben vorkommenden stickstoffanalogen Tomatidenols zu vergleichen, dessen erste Biosyntheseschritte von Cholesterol ausgehend identisch sind. Für diesen direkten Vergleich wurden deshalb dieselben Methanolextrakte, mit denen bereits die Yamogeninbestimmung vorgenommen worden war, für eine photometrische Tomatidenolbestimmung herangezogen. Diese erfolgte mit Paraformaldehyd/Phosphorsäure, dem Reagenz nach CLARKE (1958), das mit Δ^5-ungesättigten Steroidalkaloiden eine charakteristische Blaufärbung ergibt, die schon verschiedentlich zu Gehaltsbestimmungen dieser Stoffgruppe verwendet worden ist (PATT u.

WINKLER, 1960; SCHREIBER und Mitarb., 1961; SCHWARZE, 1962; WILLUHN, 1966b, 1967). Aus dem jeweils 1 g Droge entsprechenden hydrolysierten Methanolextrakt wurde nach dc Auftrennung eines aliquoten Teils in Äthylacetat/Cyclohexan (7v/3v) die Tomatidenolzone mit Chloroform/Methanol (8v/2v) eluiert, eingedampft und der Rückstand mit dem Reagenz versetzt. Die Extinktion wurde nach 40 - 50 Min. bei 601 nm gegen das Reagenz gemessen und der Tomatidenolgehalt einer vorher erstellten Eichkurve entnommen (s. Exp. Teil, S. 123). Durch Zugabe von Tomatidenol - Reinsubstanz zum Methanolextrakt wurde die Fehlergrenze der Methode mit 4,1 % ermittelt (s. Exp. Teil, S. 124). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 10 wiedergegeben und der Gehaltsänderung von Yamogenin innerhalb der Vegetationsperiode gegenübergestellt. Im Monat Mai, d.h. vor Blühbeginn der Klonpflanzen, wurde ein Tomatidenolgehalt von 0,14 % gefunden. Dieser Gehalt erreicht in den Blättern bis zum Einsetzen der Blüte im Juni 0,24 % und nimmt weiter zu bis zum Monat Juli, in dem die Pflanzen bereits fruchten, aber auch weiter blühen (0,34 %). Gegen Ende der Fruchtreife im September und Oktober weisen die Blätter nur noch 0,04 bzw. 0,01 % Tomatidenol auf. Den gleichen Gehaltsverlauf haben auch MATHÉ u. MATHÉ (1970) in mehrjährigen Untersuchungen an S. dulcamara gefunden, wonach der höchste Spirosolanolgehalt in den Monaten Juli und August auftritt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Der Yamogeningehalt der Blätter erreicht im Juli, d.h. zum

Zeitpunkt des Blühens und Fruchtens der Pflanzen, sein Maximum.

2. Anders als bei dem stickstoffanalogen Spirosolanol Tomatidenol findet im weiteren Vegetationsverlauf in den Blättern keine Abnahme des Yamogeningehaltes statt.
3. Die blühenden und fruchtenden Pflanzen enthalten in den Blättern mehr Spirostanole als Spirosolanole.

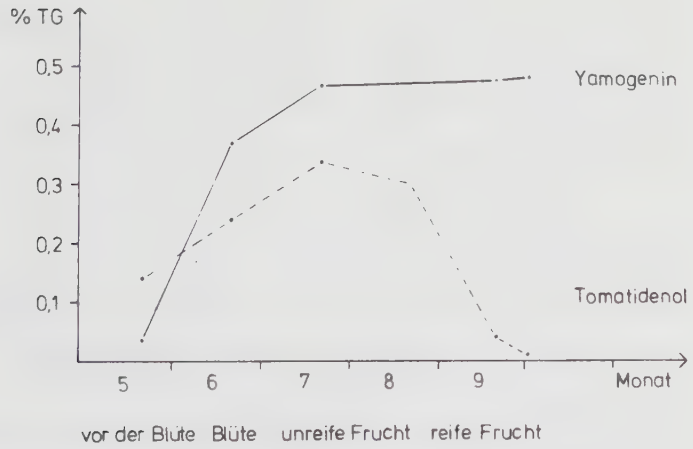


Abbildung 10: Der Yamogenin- und Tomatidenolgehalt der Blätter von Klonpflanzen der Herkunft "Schweinsberger Moor" im Verlauf einer Vegetationsperiode

4. Der Yamogenin- und Tomatidenolgehalt in Blättern unterschiedlicher Insertionshöhen

Bei der Bestimmung des Yamogeningehaltes der Blätter wurden jeweils alle zu einem gegebenen Zeitpunkt am Stengel ansitzenden Blätter geerntet und insgesamt analysiert, d.h. hier wurde nicht zwischen frisch gebildeten, kleinen, z.T. nur wenige Tage alten Blättern an der Sproßspitze und älteren, großen, mehrere Wochen oder Monate alten Blättern des basalen Sproßbereiches unterschieden. Zur Erfassung eventueller Unterschiede im Yamogeningehalt jüngerer und älterer Blätter zu einem gegebenen Erntezeitpunkt wurde bei den kultivierten Klonpflanzen der Herkunft "Schweinsberger Moor" der Yamogeningehalt in Blättern unterschiedlicher Insertionshöhe bestimmt. Die Blätter wurden am 7. Juni 1978 von bereits blühenden Pflanzen geerntet. Zu diesem Zeitpunkt führten die Blätter der 1. - 3. Insertion, also die jüngsten Blätter, 0,26 % Yamogenin. In den älteren Blättern der 4. - 6. Insertion betrug der Yamogeningehalt 0,38 % und in den noch älteren Blättern 0,48 % (s. Tab. 5).
Der während der Ontogenese gefundene Anstieg des Yamogeningehaltes bis zum Blühen und Fruchten der Pflanzen hat so seine Parallele im unterschiedlichen Yamogeningehalt junger und älterer Blätter zum gleichen Erntezeitpunkt.
Zum direkten Vergleich wurde auch hier gleichzeitig der Tomatidenolgehalt der unterschiedlich inserierten Blätter bestimmt (s. Tab. 5). Es ist ebenso eine Änderung im Tomatidenolgehalt von den jüngeren zu den älteren Blättern hin festzustellen. Die Werte entsprechen also auch hier der Gehaltsänderung, wie

sie in der Ontogenese der Pflanzen bis zum Blühen und Fruchten beobachtet wurde. Ein Gehaltsabfall in den älteren Blättern tritt zu diesem Zeitpunkt nicht ein.

Tabelle 5: Der Yamogenin- und Tomatidenolgehalt in Blättern verschiedener Insertionshöhen (Klon-Kultivars der Herkunft "Schweinsberger Moor"); Erntezeit: 7.6.1978

Insertionshöhe	% vom Trockengewicht	
	Yamogenin	Tomatidenol
1. - 3.	0,26	0,22
4. - 6.	0,38	0,23
> 7.	0,48	0,29

Vergleicht man die Änderung der Gehaltswerte für Yamogenin und Tomatidenol in den Blättern der unterschiedlichen Insertion, dann zeigt sich auch im Ausmaß dieser Gehaltsänderungen eine gute Übereinstimmung mit den Befunden der ontogenetischen Untersuchung der Monate Mai bis Juli. Auch hier verläuft der Anstieg des Yamogeningehaltes wesentlich steiler als derjenige des Tomatidenols.

5. Der Yamogenin- und Tomatidenolgehalt in der Handelsdroge "Stipites Dulcamarae"

Die "Stipites Dulcamarae", bei denen es sich um die mehrjährigen, verholzten Stengel von S. dulcamara handelt, werden

besonders in der Homöopathie noch gelegentlich verwendet. Aus diesem Grund wurde frische Handelsdroge (Fa. CAELO), deren Herkunft von Pflanzen der Tomatidenol - Sippe durch dc Analyse nachgewiesen wurde, auf den Yamogeningehalt hin untersucht. Auch hier wurde gleichzeitig der Tomatidenolgehalt der Droge

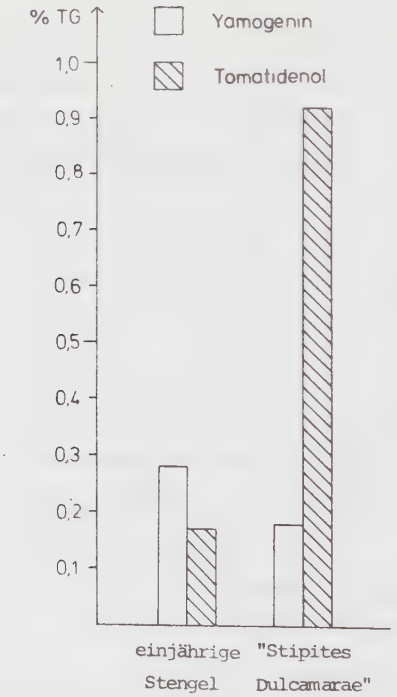


Abbildung 11: Der Yamogenin- und Tomatidenolgehalt der Handelsdroge "Stipites Dulcamarae" sowie der einjährigen Stengel der Herkunft "Schweinsberger Moor"

bestimmt. Diese Untersuchungen wurden darüber hinaus auf junge, einjährige Stengel des natürlichen Wuchsortes "Schweinsberger Moor" ausgedehnt. In Abbildung 11 sind die ermittelten Gehalte graphisch wiedergegeben. Die Handelsdroge führt mit 0,18 % verhältnismäßig wenig Yamogenin. Der Gehalt liegt unter demjenigen der analysierten einjährigen, unverholzten Stengel (0,28 %), bei denen aufgrund unserer Untersuchungen von 10 natürlichen Wuchsorten ein mittlerer Yamogeningehalt von 0,47 % zu erwarten ist (s. Abb. 9, S. 30).
Der Tomatidenolgehalt der Droge ist umgekehrt bedeutend höher als in den jungen, einjährigen Stengeln und übersteigt den Yamogeningehalt um ca. das Fünffache.

IV. Diskussion der Untersuchungsergebnisse zur Spirostanolführung

Der Gehalt an pflanzlichen Sekundärstoffen kann durch verschiedene Faktoren beeinflußt werden, die nach SCHRATZ (1960, 1961, 1963) wie folgt gegliedert werden können:

1. Morphogenetische Variabilität, die diejenigen Differenzen bezeichnet, die zu einem beliebigen Zeitpunkt zwischen verschiedenen Organen auftreten.
2. Ontogenetische Variabilität, worunter Gehaltsunterschiede verstanden werden, die mit dem Entwicklungszustand der Pflanze oder ihrer Organe zusammenhängen.
3. Modifizierender Einfluß der Umwelt, in der die Pflanze heranwächst.
4. Genetisch bedingte Variabilität.

Die neutralen Steroidsaponine von Solanum dulcamara, die ebenso wie die Steroidalkaloidglykoside als Wirkstoffe sowie als Ausgangsmaterial für die Partialsynthese von Steroidhormonen Bedeutung besitzen, waren bisher noch nicht quantitativ erfaßt worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach der dc Zuordnung der untersuchten Pflanzen zur Tomatidenol/Yamogenin - Sippe die Yamogeninführung der oberirdischen Organe von S. dulcamara - Pflanzen 10 verschiedener natürlicher Wuchsorte analysiert, die als extrem feucht (z.B. "Lahnufer") bis hin zu extrem trocken (z.B. "Düsseldorf, Oertelstr.") charakterisiert werden können. Die Analyse des Yamogeningehaltes der Blätter und Stengel jeweils zum Zeitpunkt des Blühens und Fruchtens der Pflanzen ergab Werte von 0,36 bis 0,68 % bzw. 0,26 bis 0,73 %. Nach diesen Untersuchungen ist in den Blättern und einjährigen Stengeln zu diesem Zeitpunkt mit einem mittleren Spirostanolgehalt von 0,55 bzw. 0,47 % zu rechnen (s. Abb. 9, S. 30). Die Variationsbreite in den Gehalten von Pflanzen verschiedener Herkünfte entspricht derjenigen, die MATHÉ u. MATHÉ (1978) für die stickstoffanalogen Spirosolanole in S. dulcamara ermittelt haben. Aufgrund mehrjähriger Untersuchungen geben die Autoren für das Kraut zum Zeitpunkt des Blühens und Fruchtens einen auf die Aglyka bezogenen durchschnittlichen Steroidalkaloidgehalt von ca. 0,44 % an. Die einjährigen vegetativen oberirdischen Organe von S. dulcamara führen danach mehr Spirostanole als Spirosolanole. Dieser Befund wurde durch eine gleichzeitig vorgenommene Tomatidenol- und Yamogeninbestimmung

an Blättern einer S. dulcamara - Herkunft bestätigt. Hier wurde zum Zeitpunkt des Blühens und Fruchtens der Pflanzen ein Tomatidenolgehalt von 0,34 % und ein Yamogeningehalt von 0,47 % ermittelt (s. Abb. 10, S. 33). VÁGUJFALVI und Mitarb. (1966) geben hiervon abweichend für beerenlose Triebe einer S. dulcamara - Herkunft mit 0,18 % neutralen und 0,47 % basischen Steroiden ein umgekehrtes Verhältnis dieser beiden biogenetisch verwandten Stoffgruppen an.

Nach den vorliegenden Untersuchungen kann in den Blättern von S. dulcamara mit einem Gesamtgehalt an neutralen und basischen Steroidsapogeninen von maximal 0,8 - 0,9 % gerechnet werden. Damit dürfte diese Art als industriell geeignetes Rohmaterial für die Partialsynthese therapeutisch wichtiger Steroidhormone keine Bedeutung erlangen. Hier hat die intensive Suche nach pflanzlichem Ersatzmaterial für die bald erschöpften Wildvorkommen von Dioscorea - Arten, die 2 - 18 % Diosgenin enthalten, schon einige gehaltreichere Arten hervorgebracht. So wird bereits Solanum laciniatum, das in den Blättern ca. 2 % Solasodin führt (ABOU-ZIED und Mitarb., 1978), in Osteuropa und in tropischen Ländern, vor allem in Indien und Ägypten, kultiviert (HOSODA u. YATAZAWA, 1979; vgl. auch WAGNER, 1980).

Eine interessante Steroidrohstoffquelle könnte auch Solanum aurantiacobaccatum darstellen, das in den Blättern 2,6 % Diosgenin führt, daneben jedoch keine Steroidalkaloide besitzt (CARLE und Mitarb., 1977). Als weitere Rohstoffquellen werden bereits Costus speciosus (0,6 - 2,7 % Diosgenin), Smilax -, Yucca - und Agaven - Arten herangezogen (BLUNDEN und Mitarb.,

1975).

Die unreifen Früchte von S. dulcamara weisen nach den bisher vorliegenden Untersuchungen mit ca. 1 % den höchsten Steroidalkaloidgehalt von allen Organen der Pflanze auf (u.a. WILLUHN, 1967; VERBIST, 1971; MATHÉ u. MATHÉ, 1978). Ihr Spirostanolgehalt ist mit 0,31 % jedoch bedeutend niedriger als derjenige der Blätter und Stengel (s. Abb. 9, S. 30). Während also in den Blättern die neutralen Steroide dominieren, herrschen in den unreifen Früchten die basischen Verbindungen dieser Stoffklasse vor.

Die Untersuchungen haben weiterhin ergeben, daß der Gehalt an neutralen Steroiden während der Fruchtreife ansteigt, d.h. die reifen, roten Beeren führen auf das Trockengewicht bezogen signifikant mehr Spirostanole als die unreifen, grünen Früchte (s. Abb. 9, S. 30). Die von WILLUHN (1967) beobachtete Zunahme der Fraktion der Rohsapogenine während des Rötungsprozesses in S. dulcamara - Früchten ist damit mitbedingt durch einen Anstieg der Spirostanolkonzentration während der Fruchtreife. Im Gegensatz dazu werden die Steroidalkaloide in den Bittersüß - Früchten im Zuge der Fruchtreife abgebaut (SANDER, 1963b; WILLUHN, 1967). Rote, reife Solanum - Früchte sind in der Regel nahezu frei von Steroidalkaloiden (PROKOSHEV und Mitarb., 1952; SANDER, 1956; SCHREIBER und Mitarb., 1961).

Der unterschiedliche Metabolismus der neutralen und basischen Steroidsaponine in den Früchten dürfte seine Ursache darin haben, daß der Abbau der Spirosolanole am Stickstoff der Aminoketalgruppierung einsetzt, wie dies von SANDER u. WILLUHN

(1961) vermutet wurde. HEFTMANN u. SCHWIMMER (1972) konnten zeigen, daß Tomatin in Tomatenfrüchten enzymatisch zu Allopregnenolon (3β-Hydroxy-5α-Δ^{16}-pregnen-20-on) abgebaut wird. Dieses unterschiedliche Stoffwechsel - Schicksal der neutralen und basischen Steroidsaponine konnte erstmals auch in den Blättern von S. dulcamara nachgewiesen werden. Hier ergab die ontogenetische Analyse der Yamogeninführung einen Gehaltsanstieg von 0,04 % zu Beginn bis hin zu 0,47 % gegen Ende der Vegetationsperiode. Der Yamogeningehalt der Blätter erreichte im Juli, d.h. zum Zeitpunkt des Blühens und Fruchtens ein Maximum, das dann bis zum Ende der Vegetationszeit unverändert blieb (s. Abb. 10, S. 33). Die gleichzeitig durchgeführte Tomatidenolbestimmung zeigte im Einklang mit den Untersuchungen von MATHÉ u. MATHÉ (1970), daß auch der Tomatidenolgehalt bis zum Blühen und Fruchten der Pflanzen ansteigt, gegen Ende der Vegetationszeit jedoch genau wie bei den reifen Früchten bis zum nur noch spurenhaften Vorkommen abfällt (s. Abb. 10, S. 33). Hier bliebe allerdings noch zu prüfen, ob dieser Gehaltsabfall durch eine Abwanderung in den Sproß hervorgerufen wird. Durchgeführte Pfropfungsexperimente von WILLUHN (1969) sprechen jedoch gegen eine Translokation der basischen Steroidglykoside in der Pflanze.

Die vorgenommenen Gehaltsbestimmungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der Vegetationsperiode ergeben weiterhin, daß das Überwiegen von Yamogenin in den Blättern nur für die blühenden und fruchtenden Pflanzen zutrifft. Zu Beginn der Vegetationszeit kann auch in den Blättern das stickstoffana-

loge Tomatidenol dominieren (s. Abb. 10, S. 33). Während des Wachstums der Blätter verändert sich somit nicht nur der Gesamtsteroidgehalt, sondern es treten auch Veränderungen im Mengenverhältnis dieser beiden Verbindungen auf, d.h. die beiden Steroide werden aus ihrer gemeinsamen Vorstufe während des Wachstums der Pflanzen verschieden stark gebildet.
Der Anstieg des Yamogenin- und auch des Tomatidenolgehaltes in den Blättern während ihres Wachstums bis zum Blühen und Fruchten der Pflanze hat seine Parallele in den unterschiedlichen Gehalten jüngerer und älterer Blätter zu einem bestimmten Erntezeitpunkt. Bei einsetzender Blühphase wiesen die Blätter der 1. - 3. Insertion mit 0,26 % Yamogenin und 0,22 % Tomatidenol einen etwa gleich hohen Gehalt an diesen beiden Verbindungen auf. In den älteren Blättern der 4. - 6. Insertion betrug zu diesem Zeitpunkt der Yamogeningehalt 0,38 % und in den noch älteren Blättern 0,47 % (s. Tab. 5, S. 35). Der Tomatidenolgehalt der älteren Blätter war zu diesem Zeitpunkt mit 0,29 % dagegen geringfügiger erhöht. Das Ausmaß dieser Gehaltsänderungen steht damit in Einklang mit den Ergebnissen der ontogenetischen Untersuchungen (s. Abb. 10, S. 33). Auch EVANS u. COWLEY (1972) fanden bei Digitalis purpurea - Blättern zum gleichen Erntezeitpunkt einen starken Anstieg des Spirostanolgehaltes in Blättern unterschiedlicher Insertionshöhen, d.h. auch hier zeigten sich die ältesten Blätter am gehaltreichsten.
Die erstmals durchgeführte Yamogenin - Gehaltsbestimmung der Stipites Dulcamarae, also der als Droge verwendeten mehrjähri-

gen, verholzten Stengel, ergab mit 0,18 % einen geringeren Gehalt als in den einjährigen Stengeln, in denen ein durchschnittlicher Yamogeningehalt von 0,47 % zu erwarten ist (s. Abb. 9, S. 30). Anders liegen die Verhältnisse jedoch bei den Steroidalkaloiden. Hier wurde in der Handelsdroge mit 0,92 % ein höherer Tomatidenolgehalt als in den einjährigen Stengeln gefunden (s. Abb. 11, S. 36). Den bei verholzten, mehrjährigen Stengeln ungleich höheren Steroidalkaloidgehalt hat auch VERBIST (1971) nachgewiesen, während SANDER und Mitarb. (1962) hier nur Spuren von Steroidalkaloiden gefunden haben. Von den beiden als Wirkstoffe diskutierten Steroidtypen (GESSNER u. ORZECHOWSKI, 1974) dominieren somit in der Droge die Steroidalkaloide, die demzufolge als Hauptwirkstoffe anzusehen wären.

D. Isolierung und Identifizierung der neutralen Steroidsaponine

I. Gewinnung der Rohsaponin - Fraktion und DC - Nachweis der neutralen Steroidsaponine

Zur Isolierung und Identifizierung der neutralen Steroidsaponine von S. dulcamara wurde von Pflanzen des natürlichen Wuchsortes "Schweinsberger Moor" ausgegangen, in denen als Aglykon lediglich Yamogenin nachgewiesen werden konnte (s. S. 24 ff). 4,7 kg getrocknete Blätter wurden im Soxhlet - Extraktor mit Petroläther entfettet und anschließend mit Methanol erschöpfend extrahiert. Zur Entfernung der basischen Steroidglykoside wurde der Rückstand in Wasser unter Zusatz von wenig Methanol gelöst und in der Wärme mit konz. Ammoniaklösung versetzt. Aus dem vom Niederschlag abgetrennten Filtrat wurden die neutralen Steroidsaponine mit n-Butanol ausgeschüttelt. Der viskose Rückstand der vereinigten Butanolausschüttelungen wurde gefriergetrocknet (263,2 g; entsprechend 5,6 % vom Trockengewicht der Blätter), als Rohsaponin - Fraktion zur DC - Analyse herangezogen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei - 20°C unter Stickstoff aufbewahrt.

Zur dc Auftrennung der erhaltenen Rohsaponin - Fraktion wurden zahlreiche Trennsysteme getestet. Die beste Trennung wurde in dem von DRAGALIN u. KINTYA (1975) angegebenen Fließmittel n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) erzielt (weitere geeignete Systeme s. Exp. Teil, S. 105). Die Detektion erfolgte mit EHRLICH'S Reagenz (STAHL, 1962; HEACOCK u. MAHON,

1965) und mit Anisaldehyd/H_2SO_4. Furostanolglykoside ergeben mit EHRLICH'S Reagenz eine Rotfärbung, die nach KIYOSAWA und Mitarb. (1968) für Furost-$\Delta^{20,22}$-ene oder 22-Hydroxy- bzw. 22-Alkoxyfurostanole spezifisch sein sollen. Spirostanole dagegen färben sich gelb. Es sind aber auch einige EHRLICH - negative Spirostanol- und Furostanolderivate bekannt geworden (u.a. KIYOSAWA und Mitarb., 1968) wie etwa die Pennogeninglykoside, die eine Hydroxylfunktion an C-17 besitzen (NOHARA und Mitarb., 1973). Bei der Detektion mit Anisaldehyd/H_2SO_4 färben sich Furostanol- und Spirostanolderivate gelb. Aufgrund der durchgeführten DC - Analysen führen die Blätter von S. dulcamara der Herkunft "Schweinsberger Moor" mindestens sechs Furostanolglykoside (s. Abb. 12). Das aus den Blättern dieser Herkunft isolierte Yamogenin (s. S. 24 ff) liegt somit nativ vorwiegend als Ring F - offenes Furostanolderivat vor. Daneben ließen sich zwei Spirostanolglykoside nachweisen, von denen nicht auszuschließen ist, daß sie nach Abspaltung des Zuckers an C-26 als Artefakte während der Aufarbeitung der Blätter aus den entsprechenden Furostanolderivaten entstanden sind. Derartige Umwandlungen der sehr labilen Furostanolglykoside in die entsprechenden Spirostanolglykoside wurden bei der weiteren Aufarbeitung verschiedentlich beobachtet. Die nachgewiesenen Furostanolglykoside wurden mit den Buchstaben A bis F bezeichnet.

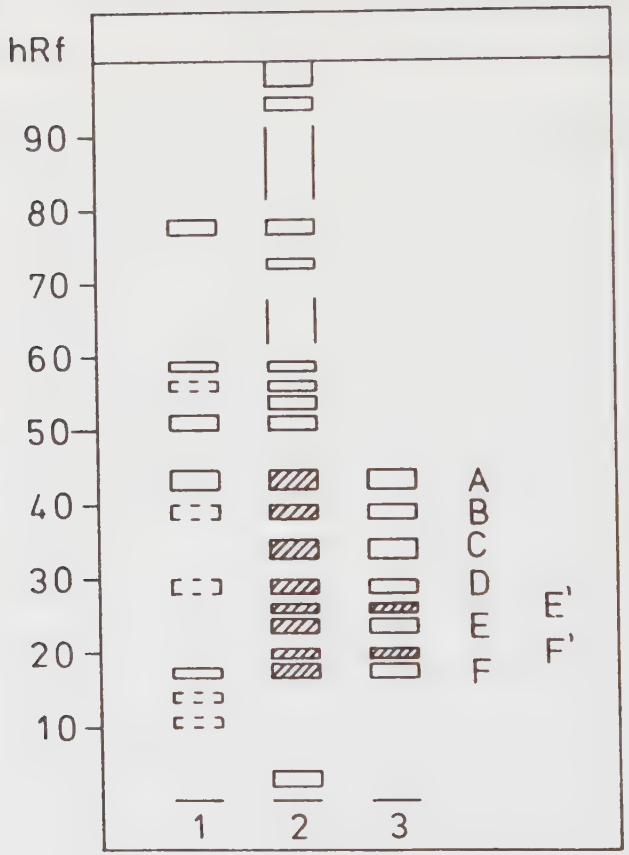


Abbildung 12: DC der Rohsaponin - Fraktion
System: n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v);
Detektion: 1 = UV - Licht ▭ 254 nm; [ ] 366 nm
2 = Anisaldehyd/H_2SO_4 ▨ gelb
3 = EHRLICH'S Reagenz ▭ rot; ▨ gelb

II. Reinigung und Fraktionierung der Rohsaponin - Fraktion

Vor der säulenchromatographischen (sc) Fraktionierung der Rohsaponin - Fraktion wurde diese in Anlehnung an KAWANO und Mitarb. (1977) mit Äthanol über eine Säule mit schwach saurem Ionenaustauscher eluiert und die neutralen Saponine aus dem eingeengten Eluat mit Äther ausgefällt (s. Exp. Teil, S. 125). Nach diesen Reinigungsschritten wurden die Saponine an Kie-

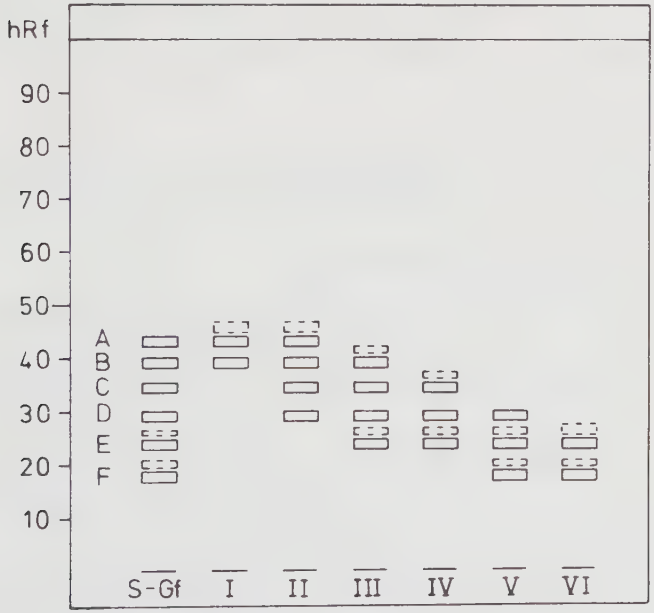


Abbildung 13: DC der nach sc Auftrennung erhaltenen Teilfraktionen I - VI
System: n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v);
Detektion: EHRLICH'S Reagenz ▭ rot; ▭ gelb

selgel mit n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) sc aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen nach dc Kontrolle zu sechs Teilfraktionen vereinigt (s. Exp. Teil, S. 126). Die Zusammensetzung der Teilfraktionen ist aus Abbildung 13 ersichtlich. Neben den Furostanolglykosiden treten hier in geringen Konzentrationen weitere Spirostanolglykoside auf, die bei der Elution der Saponinfraktion über den sauren Kationenaustauscher aus den entsprechenden Furostanolglykosiden hervorgegangen sein dürften. Aus diesen Teilfraktionen wurden die neutralen Steroidsaponine nach Anreicherung durch wiederholte SC durch präparative DC isoliert.

III. Isolierung und Identifizierung des Furostanolglykosides A

1. Isolierung und Charakterisierung

Zur Isolierung des Furostanolglykosides A wurde die halbierte Teilfraktion I (1,74 g) an desaktiviertem Aluminiumoxid sc mit einem Chloroform - Methanol - Wasser - Gemisch aufgetrennt. Nach dc Kontrolle lagen hiernach 250 mg einer Fraktion vor, die neben dem bisdesmosidischen Furostanolglykosid A noch das daraus entstandene Spirostanolglykosid A enthielt. Dieses wurde durch präparative DC abgetrennt (s. Exp. Teil, S. 127). Danach wurden 170 mg farbloses bis schwach gelbliches Furostanolglykosid A erhalten. Weitere Glykosidmengen wurden durch erneute analoge Aufarbeitung der restlichen Teilfraktion I sowie aus der Teilfraktion II gewonnen.

Das viskos - amorphe Glykosid hatte einen stark bitteren Ge-

schmack. Im DC - System n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) erschien es bei hR_f = 43. In zwei weiteren Fließmittelsystemen (s. Exp. Teil, S. 105) war es dc einheitlich. Bei Beschichten der normal entwickelten Chromatogramme mit einer Blut - Gelatine - Mischung (SMOCZKIEWICZ und Mitarb., 1977) zeigte das Glykosid im Vergleich zu dem aus ihm hervorgegangenen Spirostanolglykosid nur eine sehr schwache hämolytische Aktivität. Die spezifische Drehung des Glykosides betrug $[\alpha]_D^{20}$ = - 27° (Methanol, c = 0,927). Bei 228 - 232°C trat Zersetzung unter Braunfärbung ein. Das IR - Spektrum zeigte,

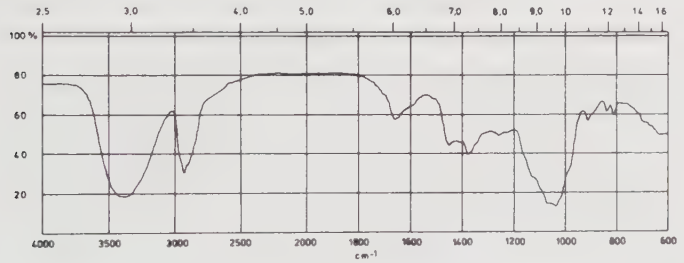


Abbildung 14: IR - Spektrum des Furostanolglykosides A

wie das anderer Furostanolglykoside auch (z.B. SATO u. SAKAMURA, 1973; KAWANO und Mitarb., 1977), nur wenig charakteristische Banden (s. Abb. 14). Die von TSCHESCHE und Mitarb. (1969a) für Furostanolglykoside angegebene schwache Bande bei 900 cm^{-1} trat im Spektrum auf; für Spirostanole charakteristische Banden (FIESER u. FIESER, 1961) waren nicht vorhanden.

2. Strukturermittlung des genuinen Aglykons

2.1. Umwandlung zum Spirostanolglykosid und Nachweis von Glucose

Den ersten Hinweis auf das Vorliegen eines bisdesmosidischen Furostanolglykosides lieferte die Rotfärbung mit EHRLICH'S Reagenz (KIYOSAWA und Mitarb., 1968) und die beobachtete leichte Umwandelbarkeit des Glykosides in ein sich gelb färbendes Derivat, das aufgrund dieser Färbung auf das entsprechende monodesmosidische Spirostanolglykosid zurückzuführen sein dürfte. Bei Furostanolglykosiden mit einer Hydroxylgruppe an C-22 erfolgt nach Abspaltung des Zuckers an C-26, bei dem es sich nach den bisher vorliegenden Untersuchungen stets um Glucose handelt, spontan die Cyclisierung zum Spiroketal bereits in neutralen wässrigen Lösungen (SCHREIBER u. RIPPERGER, 1966; TSCHESCHE und Mitarb., 1967).

Diese bereits bei der Aufarbeitung ablaufende Reaktion konnte durch Lösen des Glykosides in 0,01n methanolischer Salzsäure und Erwärmen auf 60°C quantitativ durchgeführt werden. Nach Neutralisation der Lösung, Einengung und Zusatz von Wasser wurde aus dem Ansatz das entstandene Spirostanolglykosid mit n-Butanol ausgeschüttelt. Das DC zeigte nur eine sich mit EHRLICH'S Reagenz gelb färbende Substanz mit dem im Vergleich zum eingesetzten Furostanolglykosid nur geringfügig höheren hR_f - Wert = 45 (System n-Butanol/Äthanol/Wasser = 5v/1v/1v). Auch in weiteren Systemen (s. Exp. Teil, S. 105) war es einheitlich.

In der wässrigen Phase wurde als einziger Zucker durch DC - und GC - Analyse Glucose identifiziert.

Das farblose amorphe Spirostanolglykosid A zersetzte sich im Bereich von 172 - 177°C und zeigte eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = + 5,3^{\circ}$ (Methanol, c = 0,340). Das IR - Spektrum wies die typischen Spiroketalbanden bei 912, 892 und 845 cm^{-1} auf (FIESER u. FIESER, 1961), die jedoch im Vergleich zum Genin weniger ausgeprägt waren (vgl. auch Abb. 8, S. 25). Das Spirostanolglykosid A konnte auch durch enzymatische Spaltung mit β-Glucosidase (s. S. 133) aus dem Furostanolglykosid A gewonnen werden.

2.2. Identifizierung von Yamogenin und den Zuckerkomponenten an C-3

Das Spirostanolglykosid A wurde mit 2n HCl (H_2O + CH_3OH 1v/1v) hydrolysiert, neutralisiert und das freigesetzte Aglykon mit Chloroform aus dem Hydrolysat ausgeschüttelt. Es wurde, wie auf S. 24ff beschrieben, erwartungsgemäß als Yamogenin identifiziert. Die in der wässrigen Phase vorliegenden Zucker wurden durch DC - und GC - Analyse identifiziert.

Die DC - Analyse in zwei Trennsystemen (s. Exp. Teil, S. 107) führte zur Identifizierung von Galactose, Rhamnose und Arabinose (s. Abb. 15). Die Detektion der Zucker erfolgte mit Anilinphthalat und p-Anisidiniumchlorid. Letzteres Reagenz erlaubt eine Differenzierung zwischen Pentosen und Hexosen, die sich rotbraun bzw. grünbraun färben (PETRE und Mitarb., 1976).

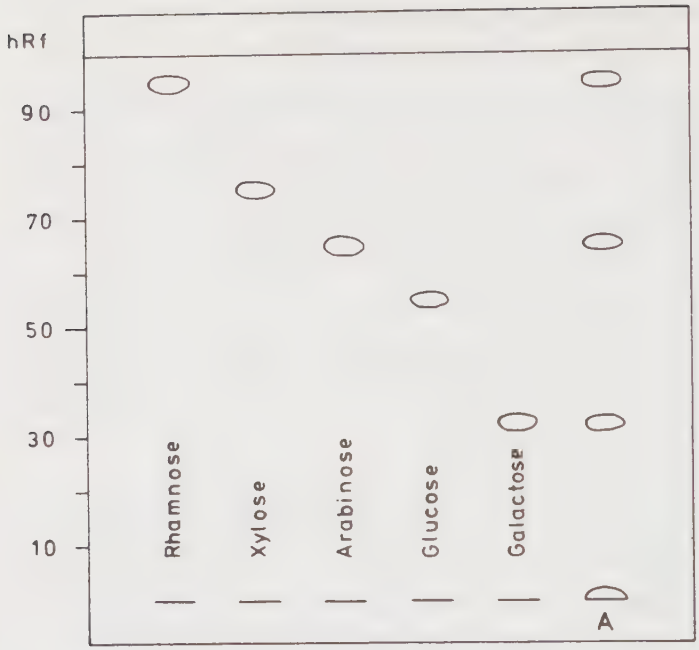


Abbildung 15: DC der Zuckerkomponenten des Spirostanolglykosides A
A = Glykosidzucker
Schicht: Kieselgur; Fließmittel: n-Butanol/Aceton/Phosphatpuffer pH 5 (4v/5v/1v);
Detektion: p-Anisidiniumchlorid in n-Butanol

Auch die GC - Analyse der Zucker erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden. Einmal wurden aus dem wasserfreien Zuckerrückstand Oxime hergestellt, diese silyliert (ZÜRCHER und Mitarb., 1975; s. Exp. Teil, S. 112) und die erhaltenen Oximsilylderivate an einer SE 30 - Säule aufgetrennt. Ebenso wurde mit Vergleichszuckern verfahren.

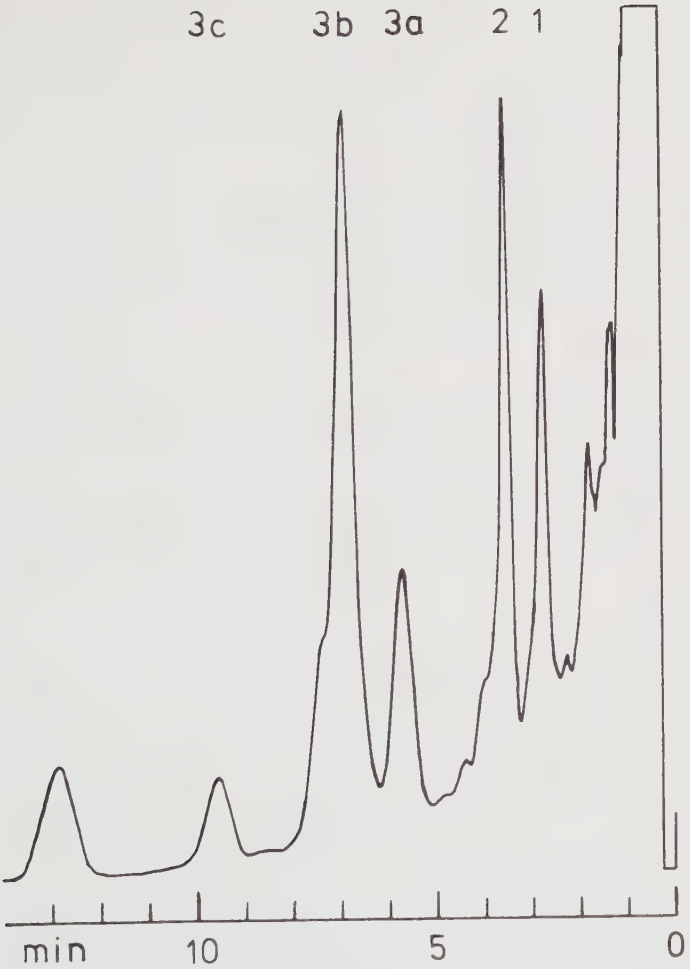


Abbildung 16: GC der Oximsilylderivate der Zuckerkomponenten des Spirostanolglykosides A
1: Arabinose; 2: Rhamnose; 3a - c: Galactose
Säule: SE 30, 3 %, 190°C, isotherm

Wie Abb. 16 zeigt, traten trotz Oximbildung vor allem bei Galactose mehrere Peaks auf, was auf eine unvollständige Reaktion zurückzuführen sein dürfte. Trotzdem ließen sich auch mit dieser Methode Arabinose, Rhamnose und Galactose identifizieren.

Eine bessere gc Identifizierung der Zucker ist nach ihrer Reduktion mit Natriumborhydrid und anschließender Acetylierung zu den entsprechenden Alditolacetaten möglich (SLONEKER, 1972).

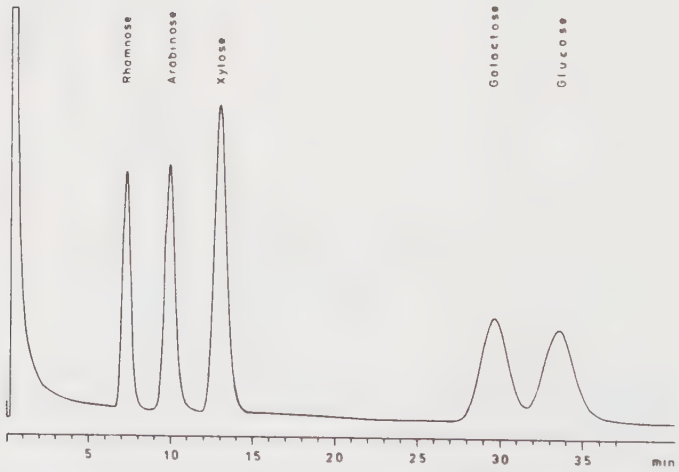


Abbildung 17: GC der Alditolacetate verschiedener Vergleichszucker
Säule: OV 225, 3 %, 190°C, isotherm (JANSSON und Mitarb., 1976)

Abb. 17 zeigt die erzielten Trennungen am GC der aus Vergleichszuckern hergestellten Alditolacetate. Mit dieser Methode konnten die Zucker des Spirostanolglykosides A eindeutig als Rham-

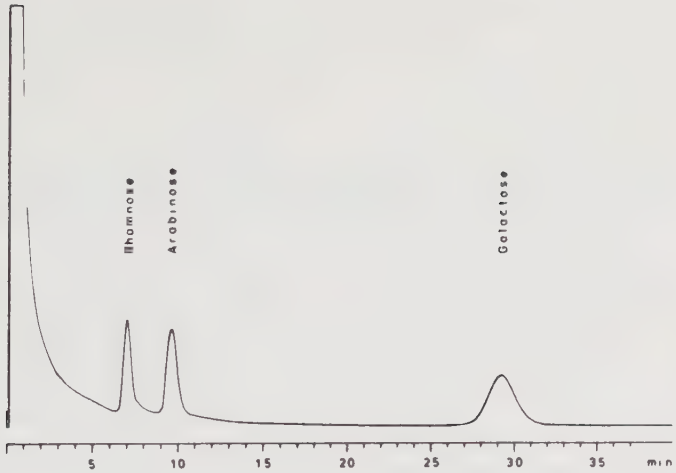


Abbildung 18: GC der in die Alditolacetate überführten Zucker des Spirostanolglykosides A
Säule: OV 225, 3 %, 190°C, isotherm

nose, Arabinose und Galactose identifiziert und ihr molares Verhältnis mit 1 : 1 : 2 ermittelt werden (s. Abb. 18). Den direkten Beweis der wahrscheinlichen Tetraosidstruktur lieferte die Bestimmung der Molmasse. Eine zur Molekulargewichtsbestimmung von großen, polaren, underivatisierten Molekülen geeignete Methode ist die Felddesorptions - Massenspektrometrie (FD - MS), die von BECKEY (1969) entwickelt und 1977 erstmals zur Analytik von Steroidsaponinen eingesetzt wurde (SCHULTEN und Mitarb.). Aufgrund der Bestimmung des Molekulargewichtes mit dieser Methode* handelt es sich bei

*Herrn Dr. H.-R. SCHULTEN, Institut für Physikalische Chemie der Universität Bonn, danke ich für die Aufnahme des FD - MS-Spektrums.

dem Spirostanolglykosid A um ein Tetraosid. Gleichzeitig wurde unter den gewählten Bedingungen dieser nur orientierenden Analyse Arabinose abgespalten.

2.3. Oxidative Spaltung des Furostanolglykosides zum Δ^{16}-Allopregnenolonglykosid und γ-Methyl-δ-hydroxy-valeriansäureglucosid

Zum eindeutigen Beweis der Struktur des genuinen Aglykons als Δ^{5}-Furosten-3β,22α,26-triol wurde das Glykosid in Pyridin/Acetanhydrid acetyliert und durch Kochen in Eisessig zum $\Delta^{20,22}$ - Derivat dehydratisiert (s. Abb. 19). Diese Verbindung wurde in der Art eines MARKER - Abbaues, wie von WALL und Mitarb. (1955) beschrieben, mit Chromtrioxid in Eisessig zu einem Esterketon oxidiert, das mit Kalium-tert.-butylat gespalten wurde.

Als Spaltprodukte sollten hiernach ein $\Delta^{5,16}$- Pregnadienolonglykosid mit der intakten Zuckerkette an C-3 des Furostanolglykosides und das γ-Methyl-δ-hydroxy-valeriansäureglucosid auftreten, das aus den abgespaltenen C - Atomen 22 bis 27 der Seitenkette hervorgeht.

Das Pregnenolonglykosid wurde durch n-Butanolextraktion von dem Säureglucosid abgetrennt und sauer hydrolysiert. Nach Neutralisation der wässrigen Phase konnten Rhamnose, Arabinose und Galactose dc nachgewiesen werden. Das Aglykon wurde aus der lipophilen Phase des Hydrolysates mit Methanol ausgefällt und durch präparative DC gereinigt. Danach war die Substanz dc rein. Sie stimmte in mehreren Systemen dc mit $\Delta^{5,16}$- Pregna-

dien-3β-ol-20-on überein, das durch Entacetylierung aus 3β-Acetoxy-$\Delta^{5,16}$- pregnadien-20-on* gewonnen wurde (s. Exp. Teil, S. 131).

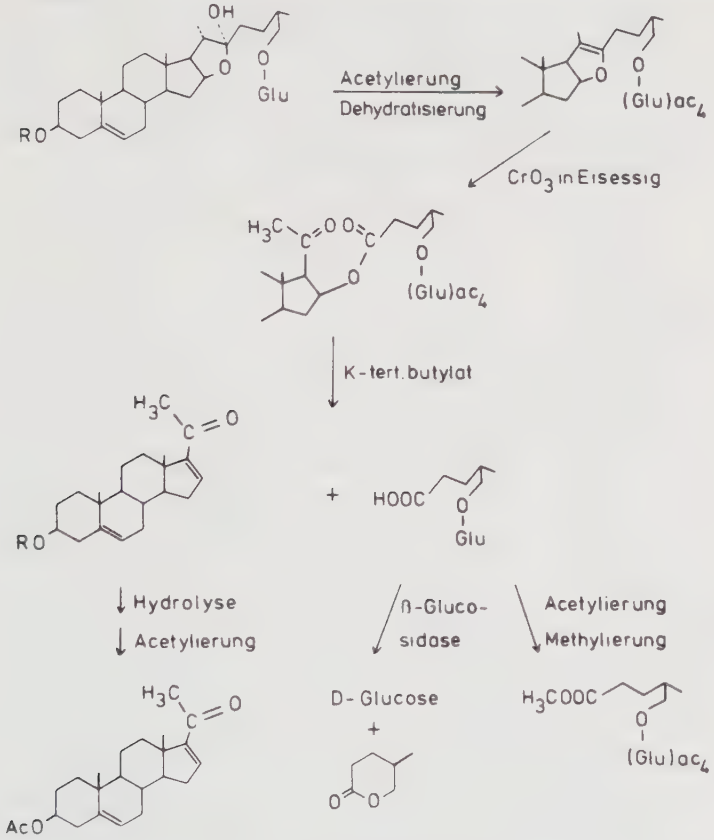


Abbildung 19: Schema der Furostanolglykosidspaltung mit Chrom(III)-oxid

---

* Herrn Prof. Dr. R. TSCHESCHE, Institut für Organische Chemie der Universität Bonn, danke ich herzlich für die Überlassung dieser Substanz.

Der Schmelzpunkt lag bei 201 - 203°C und zeigte mit der Vergleichssubstanz keine Depression. UV - und IR - Spektrum waren mit der Verbindung identisch (s. Exp. Teil, S. 131). Anschließend wurde das Aglykon in das Acetat überführt. Auch dieses Derivat stimmte dc sowie nach Schmelzpunkt (173 - 175°C), UV - und IR - Spektrum (s. Abb. 20 bzw. 21) mit authentischem 3β-Acetoxy-pregna-$\Delta^{5,16}$-dien-20-on überein.

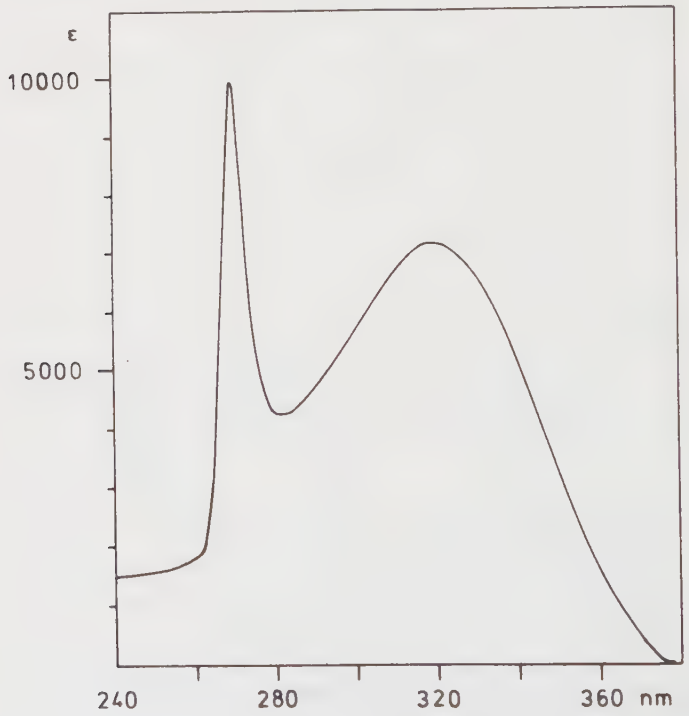


Abbildung 20: UV - Spektrum von 3β-Acetoxy-pregna-$\Delta^{5,16}$-dien-20-on (λ_{max} = 269 nm)

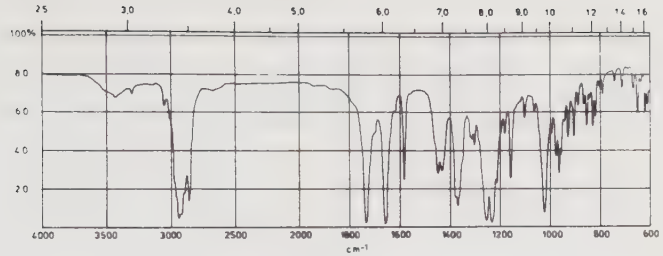


Abbildung 21: IR - Spektrum von 3β-Acetoxy-pregna-$\Delta^{5,16}$-dien-20-on

Das nach der Glykosidspaltung in der wässrigen Phase vorliegende γ-Methyl-δ-hydroxy-valeriansäureglucosid wurde auf zwei Wegen identifiziert. Ein Teil der Substanz wurde durch Acetylierung und anschließende Methylierung in das Tetraacetylglucosid des Valeriansäuremethylesters überführt (s. Abb. 19). Das Derivat wurde nach sc Reinigung an Kieselgel über sein Massenspektrum identifiziert (s. Abb. 22). Es zeigte die von TSCHESCHE und Mitarb. (1967) für diese Verbindung angegebenen Fragmente der acetylierten Glucose bei m/e = 331, 243, 242, 200, 169 und 115 (vgl. auch HEYNS u. SCHARMANN, 1963 und BIEMANN und Mitarb., 1963). Als Basispeak trat ein Fragment der Masse 129 auf, das dem Säureanteil der Verbindung entspricht und aus homolytischer Spaltung der Glykosidbindung hervorgeht. Der bei Masse 97 (C_6H_9O) auftretende Peak entsteht durch Abspaltung von Methanol aus dem Säureanteil. Ebenfalls gefunden werden konnte der für diesen Übergang charakteristische Peak bei m/e = 73. Eine dem Molekülion entsprechende

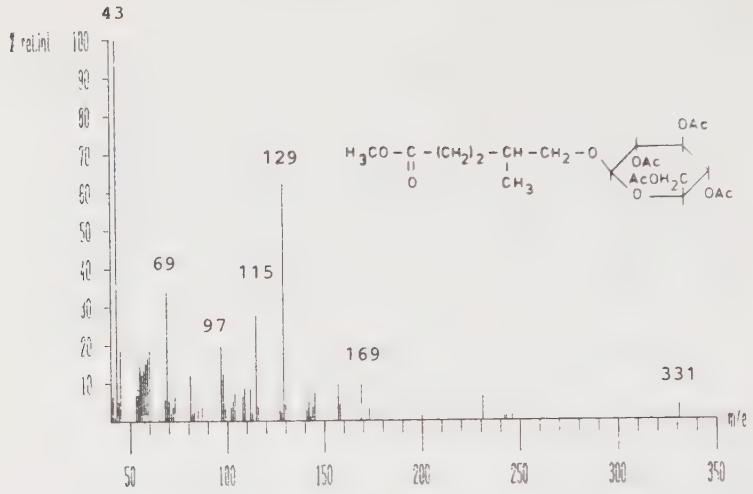


Abbildung 22: MS von γ-Methyl-δ-hydroxy-valeriansäure-methylester-glucosid-tetraacetat

Masse trat nicht auf, was bei derartigen Zuckerderivaten auch nicht zu erwarten ist (TSCHESCHE und Mitarb., 1967).

Der zweite Weg zur Identifizierung der Struktur der vom Furostanolglykosid abgespaltenen Seitenkette als γ-Methyl-δ-hydroxy-valeriansäureglucosid führt über eine enzymatische Abspaltung der Glucose mit β-Glucosidase (s. Abb. 19, S. 57). In hohen Ausbeuten entstehen hierbei D-Glucose und das δ-Lacton der γ-Methyl-δ-hydroxy-valeriansäure. Die Glucose wurde durch DC - Analyse und gc als Glucitolacetat, wie bereits beschrieben, identifiziert. Für das ölige Lacton wurde eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = -9{,}1^{\circ}$ ($CHCl_3$, c = 0,404) ermittelt, die mit den Literaturangaben für das δ-Lacton der γ-Methyl-

δ-hydroxy-valeriansäure übereinstimmten ($[\alpha]_D^{20} = -10^o$, TSCHESCHE und Mitarb., 1969a). Das Massenspektrum zeigte den Molekülpeak bei m/e = 114 und weitere Fragmente bei m/e = 84, 70, 57, 55, 43 und 41, die für diese Verbindung von TSCHESCHE und Mitarb. (1969a) angegeben werden.

Aufgrund der durchgeführten Analysen handelt es sich bei dem aus den Blättern von S. dulcamara isolierten neutralen Steroidsaponin A um ein bisdesmosidisches Furostanolglykosid mit Δ^5-Furosten-3β,22α,26-triol als Aglykon, das an C-26 in β-glykosidischer Bindung D-Glucose und an C-3 ein Tetrasaccharid aufweist, das aus 2 Mol Galactose, 1 Mol Rhamnose und 1 Mol Arabinose besteht. Da das bisher nicht bekannte Glykosid bei Hydrolyse in Yamogenin übergeht, schlagen wir als Namen die Bezeichnung Solayamocinosid A und für das daraus durch Glucoseabspaltung hervorgehende Spirostanolglykosid die Bezeichnung Solayamocin A vor.

IV. Isolierung und Identifizierung des Furostanolglykosides C

Neben dem Furostanolglykosid A bildet das Furostanolglykosid C die Hauptkomponente in der Rohsaponinfraktion (s. Abb. 12, S. 46). Nach der sc Fraktionierung fiel es in den Teilfraktionen II, III und IV an (s. Abb. 13, S. 47). Zu seiner Isolierung wurden diese Teilfraktionen jeweils an Kieselgel sc mit n-Butanol/Methanol aufgetrennt und die hierbei anfallenden Furostanolglykosid C - haltigen Fraktionen erneut an Kieselgel mit einem Chloroform - Methanol - Wassergemisch getrennt. Hiernach wurden 170 mg einer bitter schmeckenden Fraktion erhalten,

die neben dem Furostanolglykosid C (hR_f = 33) noch ein sich mit EHRLICH'S Reagenz gelb färbendes Spirostanolglykosid mit dem hR_f - Wert = 35 (n-Butanol/Äthanol/Wasser = 5v/1v/1v) führte. Die Differenz zwischen den hR_f - Werten dieser beiden Glykoside entsprach derjenigen, die zwischen dem Furostanolglykosid A und dem entsprechenden Spirostanolglykosid A gefunden worden war. Danach sollte auch hier das Spirostanolglykosid durch die leicht erfolgende Abspaltung des Zuckers von C-26 des Furostanolglykosides C entstanden sein. Durch Induzierung dieser Spiroketalbildung mit 0,01n wässriger Salzsäure bei 60°C konnte die Fraktion vollständig in das dc reine Spirostanolglykosid mit dem hR_f - Wert = 35 überführt werden. Der hierbei abgespaltene Zucker wurde durch DC - und GC - Analyse erwartungsgemäß als Glucose identifiziert.
Das Spirostanolglykosid schmolz bei 158 - 163°C unter Zersetzung. Die spezifische Drehung lag bei $[\alpha]_D^{20}$ = + 62,8° (Methanol, c = 1,082). Das IR - Spektrum wies die für die Spiroketalgruppierung charakteristischen Banden bei 912, 892 und 845 cm^{-1} auf (s. Abb. 23).

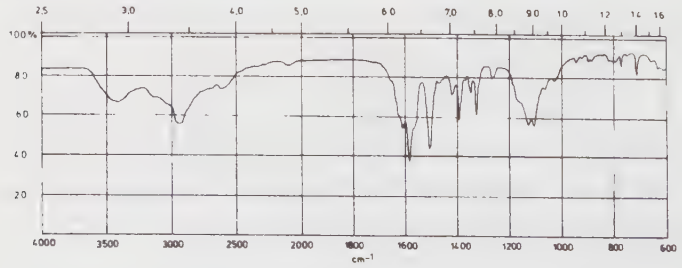


Abbildung 23: IR - Spektrum des Spirostanolglykosides C

Nach salzsaurer Hydrolyse des Glykosides wurde als Spirostanol - Aglykon Yamogenin durch Vergleich mit authentischer Substanz identifiziert und als Zuckerkomponenten dc Glucose und Galactose identifiziert, deren molares Verhältnis über die Alditolacetate gc mit 2 : 1 bestimmt wurde.
Aufgrund des hR_f - Wertes und der durchgeführten Analysen handelt es sich bei dem Furostanolglykosid C um ein bisdesmosidisches Glykosid, das an C-26 Glucose und an C-3 ein Trisaccharid, bestehend aus 2 Mol Glucose und 1 Mol Galactose, gebunden hat. Da bei seiner Hydrolyse als Aglykon Yamogenin anfällt, schlagen wir als Namen für dieses bisher nicht bekannte Glykosid Solayamocinosid C und für das daraus entstehende Spirostanolglykosid die Bezeichnung Solayamocin C vor.

V. Identifizierung der Aglykon- und Zuckerkomponenten der Furostanolglykoside B, D, E und F

Ausgehend von einigen bei der Isolierung der Furostanolglykoside A und C anfallenden Unterfraktionen sowie den Teilfraktionen V und VI (s. Abb. 13, S. 47) wurden nach wiederholter Säulenchromatographie an Kieselgel 60 und nachfolgender präparativer DC jeweils geringe Mengen (max. 12 mg) der Furostanolglykoside B, D, E und F (s. Abb. 12, S. 46) gewonnen. Bei diesen Isolierungsschritten konnte lediglich das Furostanolglykosid B dc einheitlich erhalten werden, während bei den anderen Glykosiden jeweils eine durch die Isolierungsschritte induzierte partielle Ring F - Cyclisierung zum entsprechenden Spirostanolglykosid erfolgte, sodaß im DC neben

dem Furostanolglykosid jeweils das entsprechende Spirostanolglykosid nachweisbar war (hR_f - Werte s. Tab. 6).

Tabelle 6: hR_f - Werte der Furostanolglykoside A bis F und der daraus durch Glucoseabspaltung hervorgehenden Spirostanolglykoside A bis F
(Kieselgel 60; n-Butanol/Äthanol/Wasser = 5v/1v/1v)

	hR_f - Werte	
	Furostanolglykosid	Spirostanolglykosid
A	43	45
B	36	38
C	33	35
D	28	30
E	23	25
F	18	20

Auf eine Trennung dieser Glykosidpaare wurde verzichtet. Statt dessen wurden die isolierten Glykoside durch Erwärmen mit 0,01n wässriger Salzsäure quantitativ in die entsprechenden Spirostanolglykoside überführt, wobei der abgespaltene Zucker jeweils gc als Glucose identifiziert werden konnte.
Die danach dc einheitlichen, aus den entsprechenden Furostanolglykosiden entstandenen Spirostanolglykoside B, D, E und F wurden einer Totalhydrolyse unterworfen. Das erhaltene Aglykon

wurde jeweils durch DC - Analyse, bei den Glykosiden B und F auch durch Schmelzpunkt und IR - Spektrum, als Yamogenin identifiziert. Die abgespaltenen Zucker wurden dc und nach ihrer Reduktion und Acetylierung als Alditolacetate gc identifiziert und ihr molares Verhältnis aus den Peakflächen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt, in der auch die entsprechenden Angaben für die Furostanolglykoside A und C mitaufgeführt sind.

Tabelle 7: Nach Hydrolyse identifizierte Aglyka und an C-3 gebundene Zucker der Furostanolglykoside A bis F

Furostanolglyk.	hR_f	Aglykon nach Hydrolyse	Zucker an C-3
A	43	Yamogenin	2 Galactose, 1 Rhamnose , 1 Arabinose
B	36	Yamogenin	1 Glucose , 2 Rhamnose
C	33	Yamogenin	2 Glucose , 1 Galactose
D	28	Yamogenin	2 Glucose , 1 Galactose, 2 Rhamnose
E	23	Yamogenin	4 Glucose , 1 Galactose
F	18	Yamogenin	4 Glucose , 1 Rhamnose , 1 Arabinose

Obwohl hier nur das molare Verhältnis der an C-3 gebundenen Zucker bestimmt wurde, kann aufgrund der R_f - Werte für die Furostanolglykoside B und C das Vorliegen eines Triosides, für die Furostanolglykoside D und E das Vorliegen eines Penta-

osides und für das Furostanolglykosid F ein Hexaosid angenommen werden. Die nach Abspaltung von Glucose in die entsprechenden Yamogeninglykoside übergehenden Furostanolglykoside erhielten die Bezeichnungen Solayamocinosid B, D, E und F.

VI. Versuche zur Strukturaufklärung der Zuckerketten

1. Allgemeines zu den herangezogenen Methoden

1.1. Partielle Säurehydrolyse und enzymatische Hydrolyse

Die Ermittlung der Reihenfolge, in der die Zucker eines Oligosaccharides miteinander verbunden sind, kann über eine partielle Säurehydrolyse des Glykosides erfolgen, wie dies u.a. von TSCHESCHE und Mitarb. (1973) beschrieben worden ist. Hierbei werden unter schonenden Bedingungen zunächst die endständigen Zucker des Glykosides abgespalten. Durch ihre Identifizierung sowie die Isolierung des dabei anfallenden Glykosides mit verkürzter Zuckerkette und dessen Hydrolyse bis zur Freisetzung des Aglykons werden Hinweise auf die Zuckersequenz erhalten. Bei Auftreten von Glucose oder Galactose in der Zuckerkette lassen sich diese, sofern sie endständig sind, spezifisch mit im Handel erhältlichen β-Glucosidasen bzw. β-Galactosidasen abspalten.

1.2. Methylierungsanalyse

Die Methylierungsanalyse stellt die wichtigste Methode zur Bestimmung des Substitutionsmusters der Monosaccharideinheiten in einem Glykokonjugat dar. Diese Methode liefert jedoch in der Regel keine Information über die Sequenz der Zucker oder

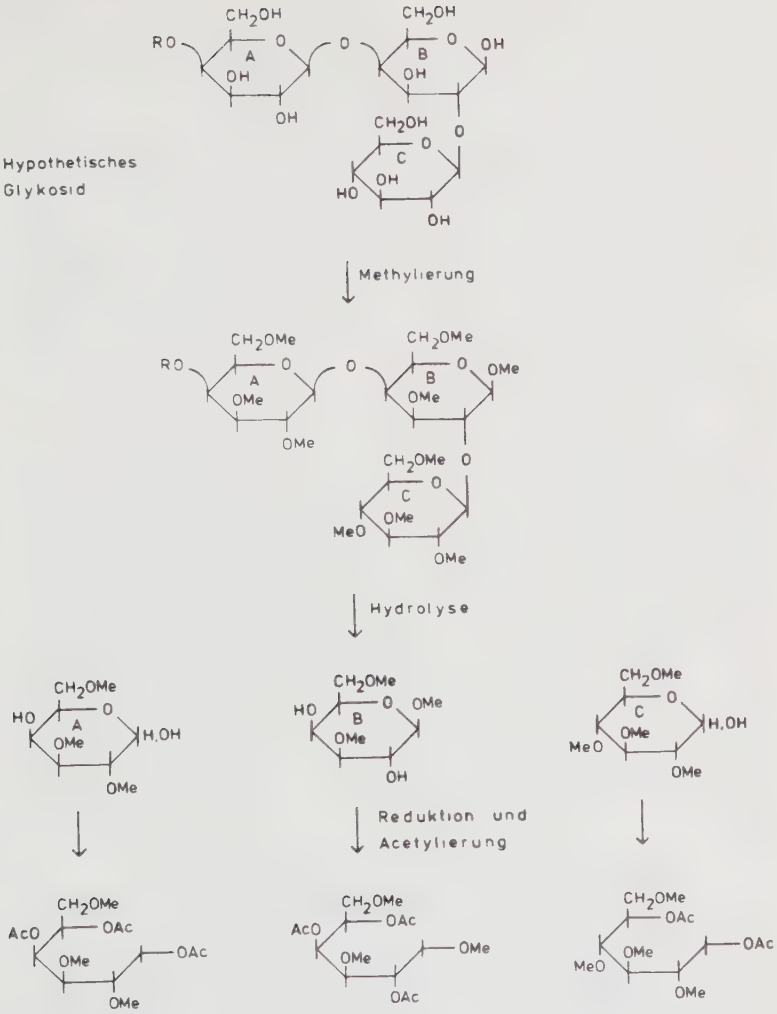


Abbildung 24: Schema der Methylierungsanalyse

über die isomeren Möglichkeiten ihrer Bindungen. Ein Leitfaden zur praktischen Durchführung einer derartigen Sequenzanalyse von Kohlenhydraten liegt von JANSSON und Mitarb. (1976) vor. Die Analyse beinhaltet die Überführung aller freien Hydroxyle des Ausgangsglykosides in Methoxygruppen, die anschließende hydrolytische Säurespaltung der glykosidischen Bindungen und die Analyse der gebildeten Monomeren. Das Substitutionsmuster der O-Methyl - Gruppen der anfallenden Monomeren spiegelt die Substitution der entsprechenden Zucker in dem Saccharid des Glykosides wider.

1.2.1. Permethylierung und Hydrolyse

Eine der Hauptschwierigkeiten der Methylierungsanalyse ist das Erreichen einer wirklich vollständigen Permethylierung. Zunächst wurde nach KUHN und Mitarb. (1960) mit Methyljodid in Dimethylformamid in Gegenwart von Bariumoxid und Bariumhydroxid oder Silberoxid gearbeitet. Hierbei konnte jedoch auch bei wiederholter Anwendung dieser Methode kein vollständig methyliertes Produkt erhalten werden. Die Kontrolle der Vollständigkeit der Methylierungsreaktion erfolgte mit Hilfe der IR - Spektroskopie, wobei auch nach mehrfacher Methylierung noch OH - Schwingungen nachgewiesen wurden.
Eine vollständige Methylierung der Glykoside wurde erst mit der Methode nach HAKOMORI (1964) erreicht. Reagenz bei der HAKOMORI - Methylierung ist Natriummethylsulfinylmethanid (Dimsyl-Natrium), das durch Einwirkung von Natriumhydrid auf wasserfreies Dimethylsulfoxid hergestellt wird, und Methyljodid. Hierbei wird das Glykosid in wasserfreiem Dimethylsulf-

oxid durch Reaktion mit Dimsyl-Natrium in das Polyalkoxid - Ion überführt, das danach durch Zufügen von Methyljodid methyliert wird.

Die anschließende Hydrolyse des permethylierten Glykosides wurde modifiziert nach WALLENFELS und Mitarb. (1963) in 2 %-iger Salzsäure (40 Std.) bzw. nach JANSSON und Mitarb. (1976) mit 0,13m Schwefelsäure (16 Std.) durchgeführt. Die Neutralisation erfolgte mit Bariumkarbonat. Im Filtrat fallen die einzelnen Methylzucker an.

1.2.2. Reduktion und Acetylierung der Methylzucker

Hier wurde weitgehend die Methode von JANSSON und Mitarb. (1976) befolgt. Die monomeren Methylzucker wurden mit Natriumborhydrid in die entsprechenden Alditole überführt. Der Überschuß an Borhydrid wurde mit saurem Ionenaustauscher zu Borsäure abgewandelt, die nach Zusatz von Methanol abdestilliert wurde. Die Acetylierung der Alditole erfolgte mit Acetanhydrid in Pyridin, wobei die überschüssigen Reagenzien durch Kodestillation mit Toluol entfernt wurden. Die Identifizierung der so hergestellten partiell methylierten Alditolacetate erfolgte durch GC - und GC - MS - Analyse.

1.2.3. GC - und GC - MS - Analyse der Alditolacetate

Die GC - Analyse der partiell methylierten Alditolacetate wurde an der von JANSSON und Mitarb. (1976) angegebenen ECNSS-M Säule (Kopolymerisat aus Äthylenglykolsuccinat und Cyanoäthylsilicon) sowie der Siliconsäule OV 225, den nach den Angaben der Autoren hierfür am besten geeigneten Systemen, durchge-

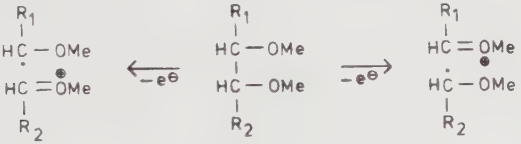
führt. Die Identifizierung der partiell methylierten Alditolacetate erfolgte durch Vergleich der relativen Retentionszeiten bezogen auf 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol als inneren Standard mit den von JANSSON und Mitarb. (1976) hierfür angegebenen Werten. Nach den Angaben der Autoren ist die Reproduzierbarkeit der relativen Retentionszeiten auf den benutzten Säulen besser als $\pm$ 3 %. In einem Falle erfolgte die Identifizierung über den direkten Vergleich mit selbst synthetisierter Vergleichssubstanz (Rhamnitolperacetat).

Zusätzliche Information wurde über die Massenspektren der gc identifizierten partiell methylierten Alditolacetate erhalten, die über eine kombinierte GC - MS - Analyse aufgenommen wurden.* Zur Interpretation der Spektren wurden die Arbeiten von HEYNS und Mitarb. (1966, 1969), BJÖRNDAL und Mitarb. (1967, 1970), BOREN und Mitarb. (1971), LÖNNGREN u. SVENSSON (1974) sowie JANSSON und Mitarb. (1976) herangezogen. Bei den abgebildeten Spektren wurde der jeweilige Basispeak gleich 100 % gesetzt und die einzelnen Massenpeaks in Relation zur Intensität dieses Hauptpeaks aufgezeichnet. Alle Peaks mit einer relativen Intensität unter 1 % blieben hierbei unberücksichtigt.

---

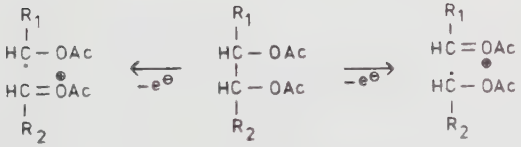
* Herrn Dr. G. SCHMIDTBERG, Institut für Organische Chemie der Universität Düsseldorf, und Herrn Dr. U. MATTHIESEN, Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf, danke ich herzlich für die Aufnahme der Spektren.

Die Fragmentierung partiell methylierter Alditolacetate nach Elektronenstoßionisierung ist vor allem von den genannten Arbeitskreisen durch Markierungsversuche intensiv erforscht worden. Ein Molekülion tritt hierbei in der Regel nicht auf, doch kann das Molekulargewicht der Ausgangsverbindung durch Addition von Fragmentpaaren ermittelt werden. Primärfragmente werden durch Spaltung von C - C - Bindungen in der Kette gebildet. Der Bruch zwischen zwei methoxylierten C - Atomen (I) ist häufiger als der Bruch zwischen einem methoxylierten und



I

II



III

Abbildung 25: Primärfragmentierungen partiell methylierter Alditolacetate

einem acetoxylierten C - Atom (II) und dieser ist wiederum häufiger als der Bruch zwischen zwei acetoxylierten C - Atomen (III). Diese Primärfragmentierungen sind in Abbildung 25 dargestellt.

Die genannten Primärfragmente sind Ausgangsbruchstücke für die Bildung von Sekundärfragmenten. Diese entstehen normalerweise durch die Abspaltung von Essigsäure (60 Masseneinheiten = ME), Methanol (32 ME), Keten (42 ME) oder Formaldehyd (30 ME). Abbildung 26 zeigt diese Sekundärfragmentierung am Beispiel eines Fragmentes mit der Masse = 161.

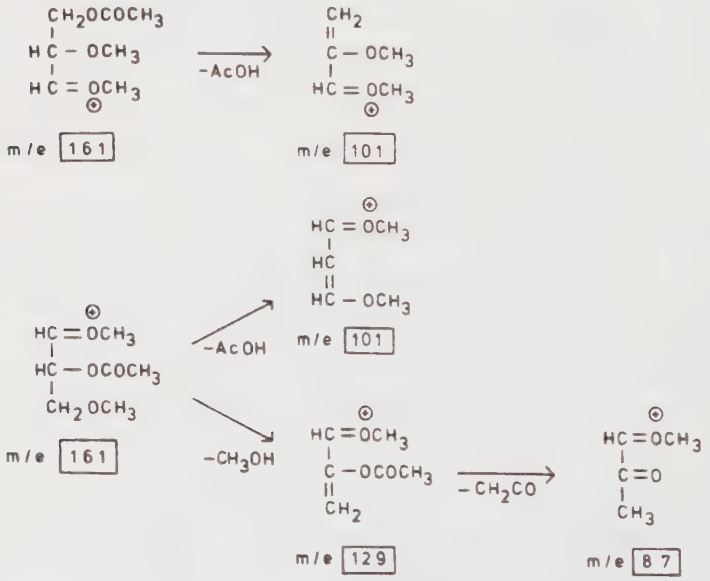


Abbildung 26: Sekundärfragmentierungen von Fragmenten der Masse m/e = 161

2. Die Struktur des Tetrasaccharides am Furostanolglykosid A (= Solayamocinosid A)

2.1. Partialhydrolyse des Glykosides

Nach den bisher durchgeführten Analysen hat das Furostanolglykosid A am C-3 ein Tetrasaccharid, bestehend aus 1 Mol Arabinose, 2 Mol Galactose und 1 Mol Rhamnose, gebunden (s. S. 51 ff). Das Fehlen von Glucose in diesem Tetraosid ermöglichte die Überführung des Furostanolglykosides A in das entsprechende Spirostanolglykosid A durch eine enzymatische Hydrolyse mit β-Glucosidase. Diese wurde in Anlehnung an TSCHESCHE u. GUTWINSKI (1975) durchgeführt, wobei in der wässrigen Phase dc und gc erneut Glucose nachgewiesen werden konnte.
35 mg von dem so erhaltenen Spirostanolglykosid A (= Solayamocin A) wurden in einer Mischung aus O,6n Salzsäure und Methanol (1v/1v) 60 Min. lang am Rückfluß hydrolysiert. Das eingeengte Hydrolysat wurde mit Wasser versetzt und mit n-Butanol ausgeschüttelt. In der eingeengten Butanolphase ließen sich dc zwei Spirostanolglykoside mit den hR_f - Werten 59 und 73 nachweisen (n-Butanol/Äthanol/Wasser = 5v/1v/1v). Das eingesetzte Solayamocin A (hR_f 45) sowie das Aglykon Yamogenin (hR_f 92) traten im DC nicht auf.
In der mit basischem Ionenaustauscher neutralisierten wässrigen Phase wurden dc Arabinose und Galactose gefunden. Rhamnose war nicht nachweisbar. Die mit n-Butanol ausgeschüttelten Spirostanolglykoside mit verkürzter Zuckerkette wurden anschließend einer Totalhydrolyse unterworfen. Danach wurden im

Hydrolysat neben dem Aglykon Yamogenin wenig Galactose sowie Rhamnose nachgewiesen. In einem weiteren Ansatz wurde eine Partialhydrolyse mit einer 0,4n methanolischen Salzsäure durchgeführt (0,8n HCl + Methanol, 1v/1v). Hierbei wurden in der wässrigen Phase dc Arabinose, Galactose und Spuren von Rhamnose nachgewiesen, während in der Butanolausschüttelung neben wenig Yamogenin das Spirostanolglykosid mit dem hR_f - Wert 73 auftrat. Nach anschließender Totalhydrolyse dieses Glykosides wurden im Hydrolysat Yamogenin und Rhamnose gefunden, sodaß es sich bei diesem Glykosid um ein Yamogeninrhamnosid gehandelt haben muß.
Aufgrund der durchgeführten Analysen kann angenommen werden, daß Solayamocin A am Aglykon Rhamnose gebunden hat und die Arabinose endständig ist.

2.2. GC - und GC - MS - Analyse der partiell methylierten Alditolacetate

12 mg Solayamocin A wurden permethyliert und anschließend hydrolysiert (s. Exp. Teil, S. 111). Bei der GC - Analyse der in die Alditolacetate überführten partiell methylierten Zucker an zwei Säulen traten im molaren Verhältnis von 1 : 2 : 1 drei partiell methylierte Alditolacetate auf, die anhand ihrer relativen Retentionszeiten bzw. durch direkten Vergleich als 2,3,4-Trimethylarabitoldiacetat, 2,3,4,6-Tetramethylgalactitoldiacetat und Rhamnitolperacetat identifiziert wurden (s. Tab. 8).

Tabelle 8: Nach Permethylierung von Solayamocin A im Hydrolysat auftretende Methylzucker, identifiziert durch GC - Analyse ihrer Alditolacetate

(RRT = Relative Retentionszeit bezogen auf 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol; RT = 14,0 Min.. In Klammern Literaturangaben von JANSSON und Mitarb. (1976); Pentaacetylrhamnitol = direkter Vergleich).

Alditolacetat	RRT	
	OV 225	ECNSS-M
1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-arabitol	0,54 (0,53)	0,73 (0,73)
1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-galactitol	1,19 (1,15)	1,25 (1,24)
Penta-O-acetyl-rhamnitol	1,89	2,13

Die durch GC - Analyse an zwei Trennsäulen erfolgte Identifizierung der drei Alditolacetate wurde durch die Aufnahme der Massenspektren bestätigt. Die Abbildungen 27 bis 29 zeigen die Massenspektren und einige typische Fragmentierungswege der drei Alditolacetate, die mit dem Vorliegen von 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylarabitol, 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactitol und Penta-O-acetylrhamnitol im Einklang stehen (s. JANSSON und Mitarb., 1976).

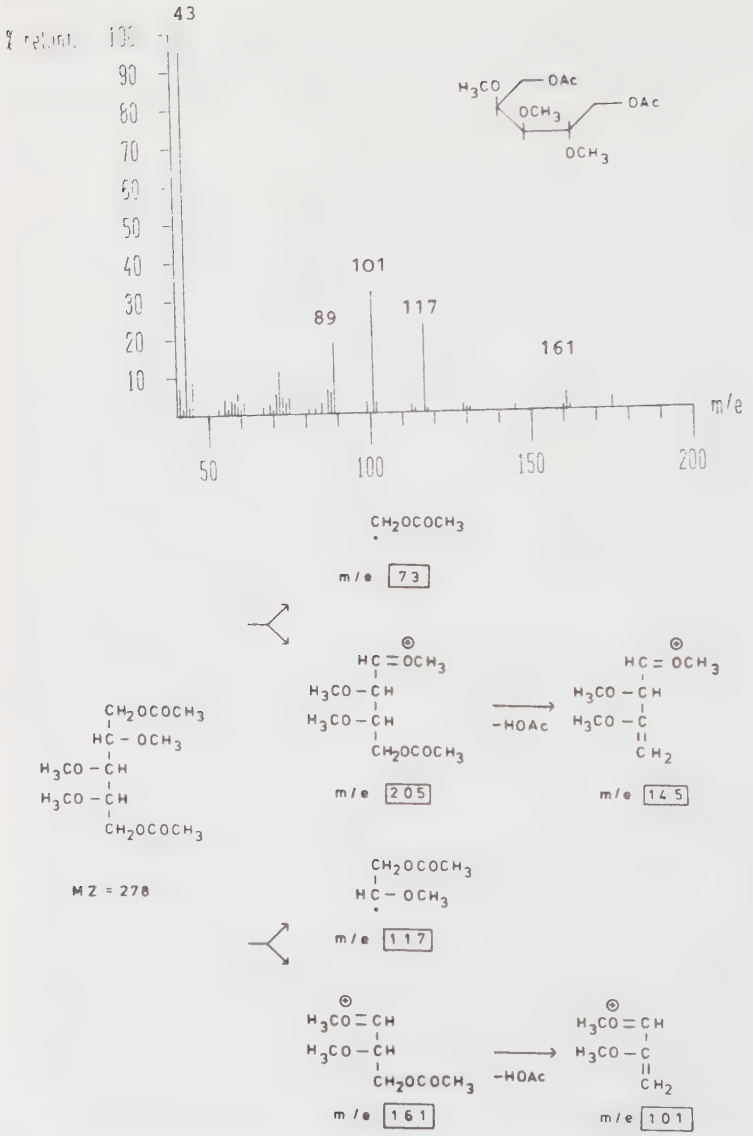


Abbildung 27: Massenspektrum und einige Fragmentierungswege von 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylarabitol

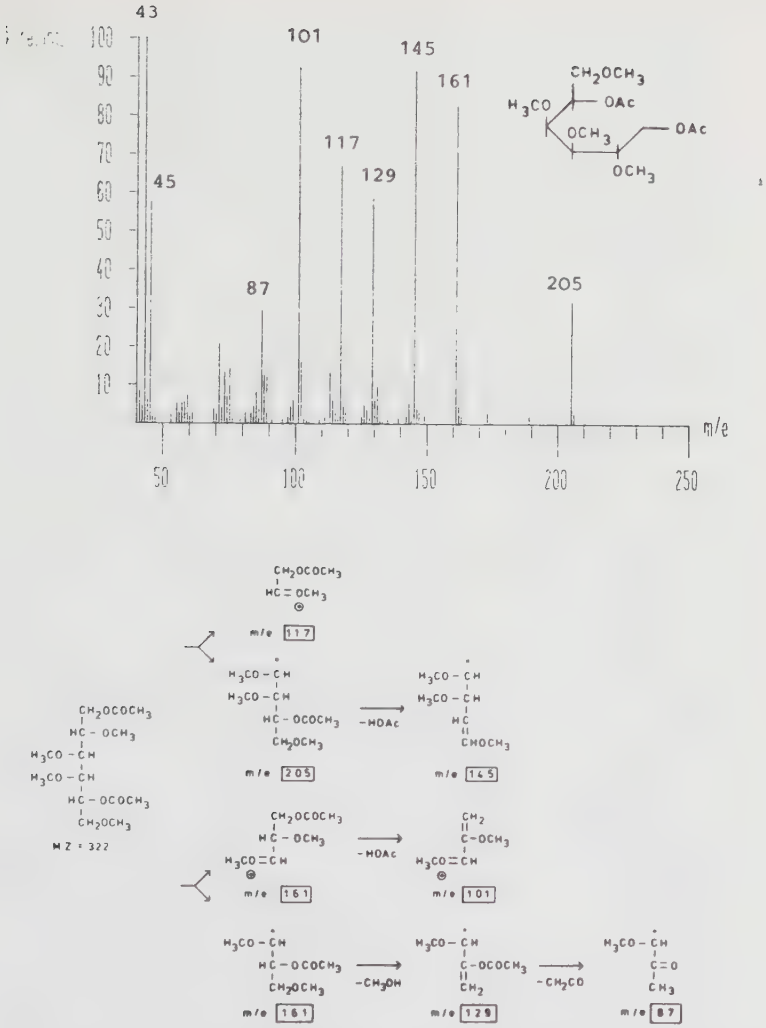


Abbildung 28: Massenspektrum und einige Fragmentierungswege von 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactitol

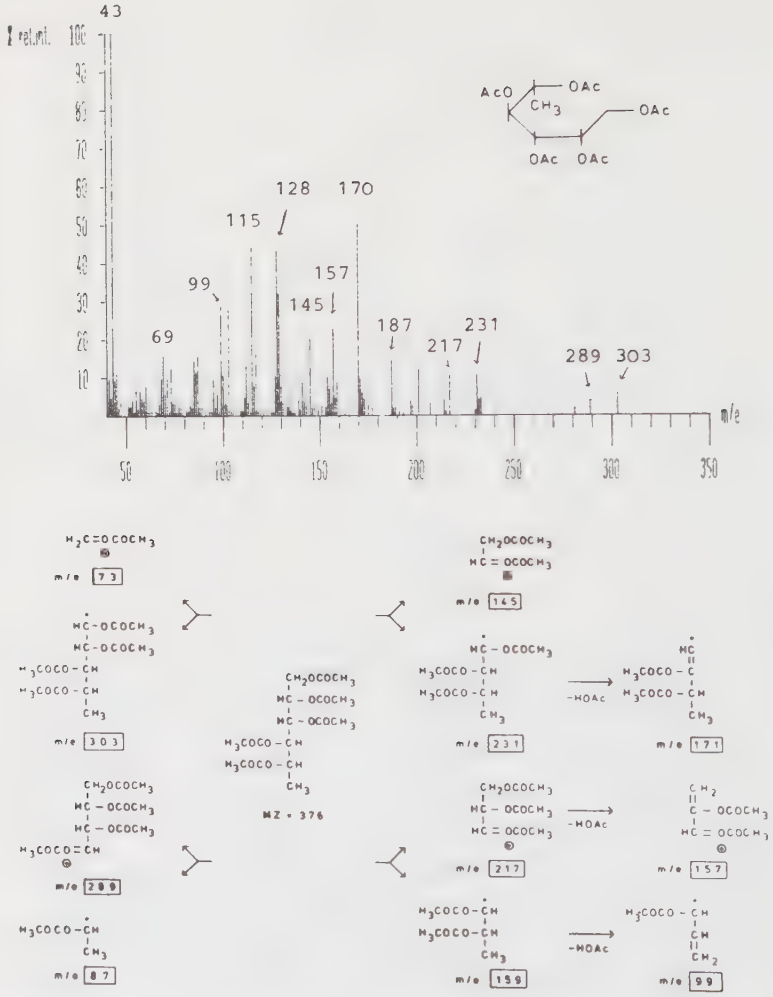


Abbildung 29: Massenspektrum und einige Fragmentierungswege von Penta-O-acetyl-rhamnitol

Basispeak ist bei allen drei Verbindungen das Acetylkation m/e 43. Die relativen Intensitäten der typischen MS - Fragmente sind in Tabelle 10, S. 80 zusammengefaßt. Von 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactitol und Penta-O-acetylrhamnitol wurde darüber hinaus die Massenzahl ihres Molekülions (322 bzw. 376) durch MS - Analyse nach chemischer Ionisierung bestimmt (s. Exp. Teil, S. 136 f).

Im Einklang mit den Hinweisen aus der Partialhydrolyse bestätigt die Methylierungsanalyse, daß Solayamocin A am C-3 des Aglykons Rhamnose gebunden hat und die drei anderen Zucker alle endständig an den drei zur Verfügung stehenden OH - Gruppen der pyranosidischen Rhamnose stehen. Die beiden Galactosemoleküle sind über C-1 an die Rhamnose gebunden. Die Arabinose liegt als Pyranose vor und ist ebenfalls über C-1 mit der Rhamnose verknüpft.

Nach diesen Analysen blieb zu klären, an welchen C - Atomen der Rhamnose die Galactosen bzw. die Arabinose gebunden sind. Zur Klärung der Stellung der Galactosen wurden diese von Solayamocin A mit β-Galactosidase abgespalten (s. Exp. Teil, S. 135) und mit dem dabei anfallenden Yamogeninrhamnosylarabinosid die Methylierungsanalyse durchgeführt. Hierbei fiel wiederum 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylarabitol an, während die Rhamnose nach Abspaltung der beiden Galactosemoleküle nunmehr als 1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4-di-O-methylrhamnitol vorlag, das durch GC - Analyse an der OV 225 - Säule (Retentionszeit bezogen auf 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol = 0,84; JANSSON und Mitarb., 1976: 0,87) und über das Massenspektrum (s. Abb. 30, S. 81) identifiziert wurde.

Tabelle 9: Typische MS - Fragmente der identifizierten partiell methylierten Alditolacetate und ihre relativen Intensitätsunterschiede (alle freien Hydroxylgruppen sind acetyliert)

m/e	2,3,4-Tri-O-methyl-arabitol	Penta-O-acetyl-rhamnitol	3,4-Di-O-methyl-rhamnitol	2,3,4-Tri-O-methyl-rhamnitol	2,3,4-Tri-O-methyl-glucitol	2,3,4,6-Tetra-O-methyl-galactitol
43	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
45	9,6	11,6	15,6	14,8	29,9	57,6
71	5,2	9,8	6,9	6,0	11,4	20,7
72	11,1	1,0	6,0	14,1	2,6	4,7
73	4,3	12,5	3,5	5,0	5,0	13,5
87	6,2	15,4	18,3	7,1	29,3	29,5
89	18,6	2,6	28,2	31,6	6,0	12,2
99	2,9	28,7	12,1	2,6	31,3	6,1
101	31,7	3,7	6,4	42,9	49,2	92,6
117	23,0	16,2	7,1	21,2	41,7	67,2
129	2,0	31,8	19,2	2,4	16,0	58,5
131	1,0	3,8	25,2	18,4	4,0	9,7
145	1,7	20,3	1,5	1,2	19,3	92,0
161	8,6	1,0	2,6	12,7	10,8	82,9
175	3,2	3,8	2,7	5,9	-	1,0
189	-	2,3	2,1	1,0	9,4	2,1
205	-	-	-	1,0	1,6	32,2

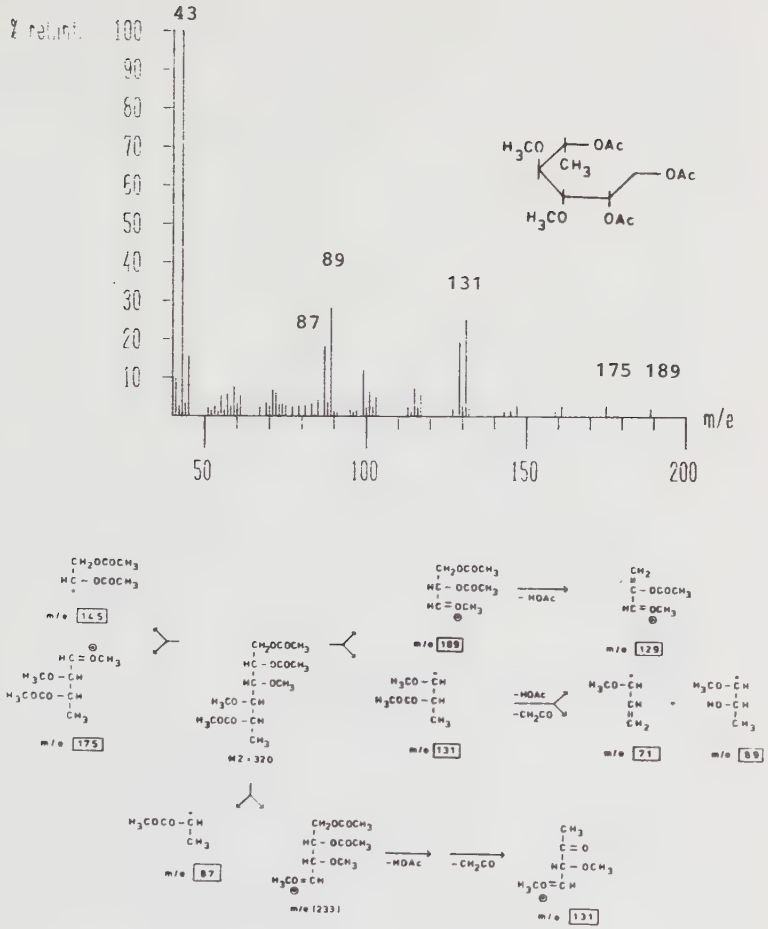


Abbildung 30: Massenspektrum und einige Fragmentierungswege von 1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4-di-O-methylrhamnitol

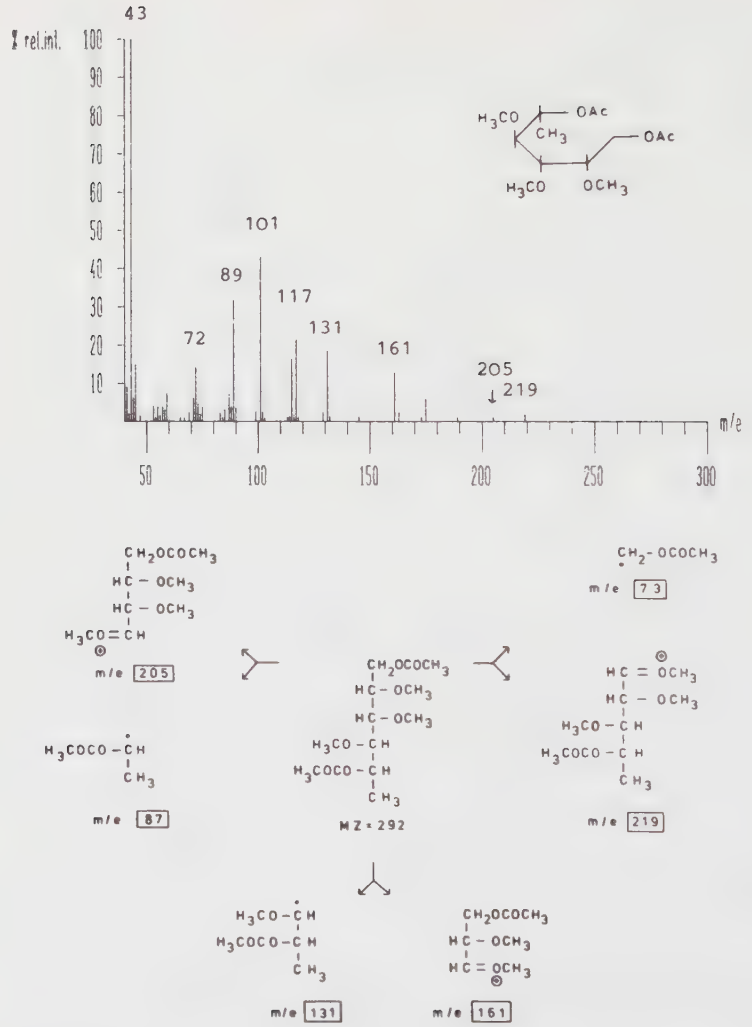


Abbildung 31: Massenspektrum und einige Fragmentierungswege von 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylrhamnitol

Die beiden Galactosemoleküle sind somit über C-1 ß-glykosidisch an C-3 und C-4 der Rhamnose gebunden, sodaß für die Arabinose nur noch die Bindung an C-2 der Rhamnose möglich ist. Eine weitere Bestätigung dieser Struktur wurde über die Isolierung des nach Partialhydrolyse von Solayamocin A erhaltenen Yamogeninrhamnosides mit dem hR_f - Wert 73 (s. S. 74) erhalten. Die Methylierungsanalyse von diesem durch präparative DC aus der Butanolphase abgetrennten Glykosid führte zur gc Identifizierung des partiell methylierten Zuckers über sein Alditolacetat als 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylrhamnitol (Retentionszeit an der OV 225 - Säule bezogen auf 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactitol = 0,36, JANSSON und Mitarb., 1976: 0,35). Die Struktur dieser Substanz wurde durch das Massenspektrum bestätigt (s. Abb. 31).

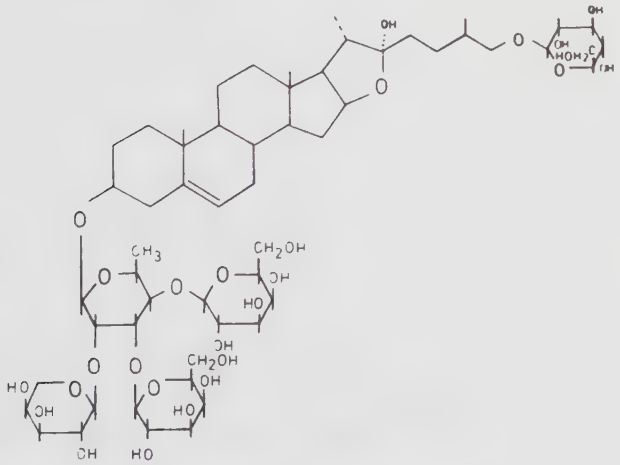


Abbildung 32: Die Struktur von Solayamocinosid A

Aufgrund der durchgeführten Analysen handelt es sich bei Solayamocinosid A (= Furostanolglykosid A) um 3-O-{[Arabinopyranosyl-(1→2)]-[β-galactopyranosyl-(1→3)]-[β-galactopyranosyl-(1→4)]-rhamnopyranosyl}-3β,22α,26β-triol-25S-furost-5-en-26β-glucopyranosid (s. Abb. 32).

3. Die Struktur des Trisaccharides am Furostanolglykosid C (= Solayamocinosid C)

Der Zucker am C-3 des Furostanolglykosides C wurde als Trisaccharid, bestehend aus 2 Mol Glucose und 1 Mol Galactose, identifiziert (s. S. 63). Um Rückschlüsse auf die Sequenz dieser Zucker zu erhalten, wurden 30 mg des nach Abspaltung der Glucose an C-26 erhaltenen entsprechenden Yamogeninglykosides Solayamocin C mit einer Mischung aus 0,6n HCl und Methanol (1v/1v) 60 Min. lang am Rückfluß hydrolysiert (TSCHESCHE und Mitarb., 1973). Nach dieser Partialhydrolyse war dc im System n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) das eingesetzte Yamogeninglykosid (hR_f 35) nicht mehr nachweisbar. Statt dessen traten zwei neue, durch partielle Zuckerabspaltung entstandene Spirostanolglykoside mit den hR_f - Werten 48 und 67 auf. In der wässrigen Phase wurden dc Galactose und Glucose identifiziert.

Anschließend wurden die mit n-Butanol ausgeschüttelten beiden Spirostanolglykoside mit 2n HCl total hydrolysiert. Danach war im Hydrolysat neben Yamogenin als einziger Zucker Glucose nachweisbar.

Aus der durchgeführten Partialhydrolyse folgt, daß eine Glucose

geninständig sein muß und die zweite Glucose mit dieser verknüpft ist, da bei beiden nach Partialhydrolyse angefallenen Yamogeninglykosiden nur Glucose als Zuckerkomponente nachweisbar war. Die vollständige Abspaltung der Galactose deutet darauf hin, daß diese endständig ist. Somit liegt beim Solayamocin C eine lineare Zuckerkette aus Glucose - Glucose - Galactose vor, die über Glucose am Aglykon gebunden ist.
Die nach bereits beschriebener Methode durchgeführte Methylierungsanalyse von Solayamocin C führte zur Identifizierung von 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactitol (s. Abb. 28, S. 77), 1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methylglucitol und 1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylglucitol (s. Abb. 33). Die aus der GC - Analyse an der OV 225 - Säule bestimmten relativen Retentionszeiten bezogen auf 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol sind in Tabelle 10 aufgeführt. Auch dieses Ergebnis beweist das Vorliegen eines linearen Trisaccharides mit einer endständigen Galactose.
Zur Beantwortung der Frage, welches der beiden Glucosemoleküle am Aglykon gebunden ist, wurde von Solayamocin C die endständige Galactose enzymatisch abgespalten und das verkürzte Glykosid der Methylierungsanalyse unterworfen. Gaschromatographisch wurden hiernach 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol und wiederum 1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylglucitol nachgewiesen (s. Tab. 10), was durch die Aufnahme der Massenspektren bestätigt wurde. Das Massenspektrum von 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol gleicht dem von 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactitol (s. Abb.

28, S. 77), da sich stereoisomere partiell methylierte Aldi-tolacetate massenspektrometrisch nicht unterscheiden lassen (JANSSON und Mitarb., 1976).

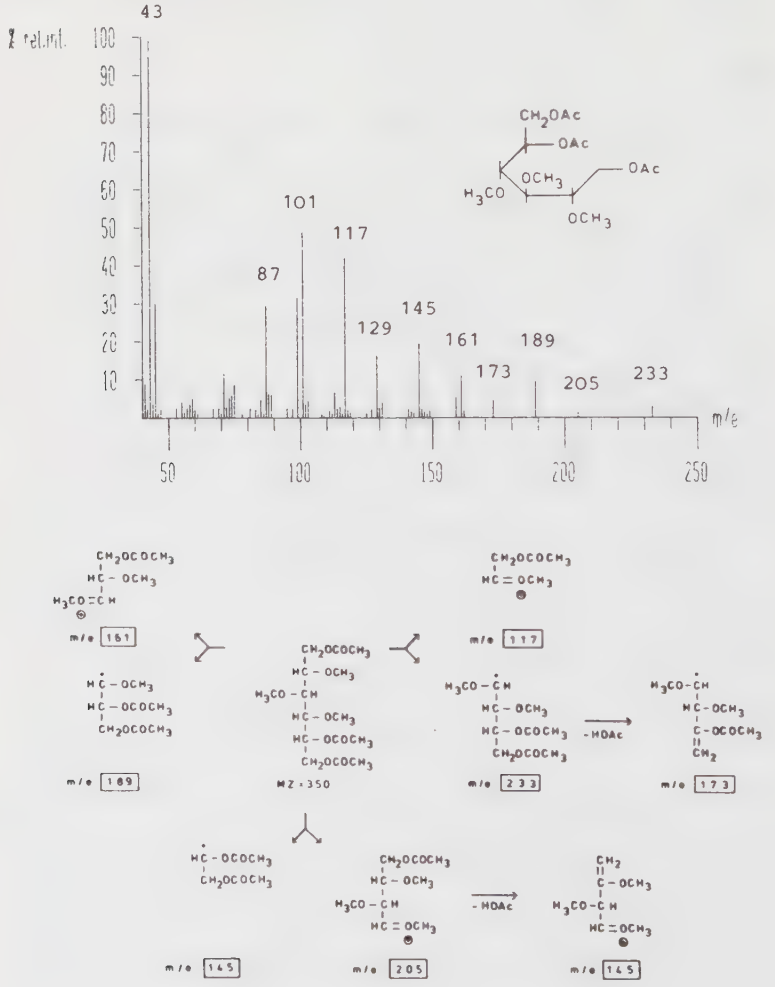


Abbildung 33: Massenspektrum und einige Fragmentierungswege von 1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylglucitol

Tabelle 10: Nach Permethylierung von Solayamocin C im Hydrolysat auftretende Methylzucker, identifiziert durch GC - Analyse ihrer Alditolacetate

(Säule: OV 225; RRT = Relative Retentionszeit bezogen auf 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol. RT = 14,0 Min.. Literaturangaben von JANSSON und Mitarb., 1976).

Alditolacetat	RRT	RRT Lit.
1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylglucitol	2,21	2,22
1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methylglucitol	1,83	1,83
1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactitol	1,19	1,15
1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol	1,00	1,00

Da die 2,3,4-Trimethylglucose sowohl vor als auch nach Galactoseabspaltung auftritt, bedeutet dies, daß diese Glucose am Aglykon gebunden sein muß, während das Glucosemolekül mit den ursprünglich freien Hydroxylgruppen an C-3, C-4 und C-6 in der Mitte der Zuckerkette stehen muß. Nach der Galactosidase -

Behandlung trat an dieser Glucose zusätzlich eine OH - Gruppe an C-2 auf, d.h. die Galactose ist über ihr C-1 am C-2 der Glucose verknüpft. Unter der Annahme, daß die Glucose unter Abspaltung ihrer glykosidischen Hydroxylgruppe am C-3 von Yamogenin gebunden ist, ergibt sich für Solayamocin C die Struktur eines Yamogenin-3-O-[β-galactopyranosyl-(1→2)-gluco pyranosyl-(1→6)]-glucopyranosids (s. Abb. 34).

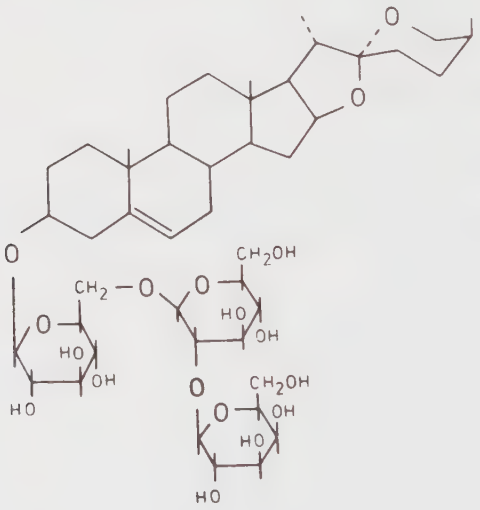


Abbildung 34: Die Struktur von Solayamocin C

Nativ liegt diese Substanz als bisdesmosidisches Furostanol-glykosid vor, das als Solayamocinosid C bezeichnet wurde und die Konstitution eines 3-O-[β-D-Galactopyranosyl-(1→2)-gluco-pyranosyl-(1→6)-glucopyranosyl]-3β,22α,26β-triol-25S-furost-5-en-26β-glucopyranosids besitzt.

VII. DC - Nachweis neutraler Steroidsaponine in Stengeln, Blüten und Früchten der Tomatidenol - Sippe von S. dulcamara

Im ersten Teil der Arbeit wurde in den oberirdischen Organen der Tomatidenol - Sippe von S. dulcamara Yamogenin nachgewiesen und sein Gehalt bestimmt (s. Tab. 4, S. 28). Für die Blätter der Herkunft "Schweinsberger Moor" konnte anschließend gezeigt werden, daß Yamogenin hier nativ in Form von sechs verschiedenen Furostanolglykosiden vorliegt, die die Bezeichnungen Solayamocinosid A bis F erhielten. Im folgenden soll durch DC - Analyse geprüft werden, ob diese Solayamocinoside auch von den anderen oberirdischen Organen gebildet werden und inwieweit mit einer Variation der Glykosidbildung in Pflanzen anderer natürlicher Wuchsorte zu rechnen ist.
Mit dieser Zielsetzung wurden die Blätter, Stengel, Blüten und unreifen sowie reifen Früchte von Tomatidenol - Pflanzen der in Tabelle 2 (S. 19) aufgeführten Herkünfte dc in dem als optimal ermittelten System n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) analysiert. Zur Herstellung der Rohsaponin - Fraktion wurden jeweils 50 g der bei 40°C getrockneten und pulverisierten Pflanzenorgane mit Methanol im Soxhlet erschöpfend extrahiert. Die Methanolextrakte wurden im Vakuum eingeengt und nach Zusatz von Wasser zur Entfernung lipophiler Bestandteile mit Petroläther ausgeschüttelt. Danach wurden die basischen Steroidsaponine bei 60 - 70°C mit konz. Ammoniaklösung ausgefällt und die neutralen Steroidsaponine aus dem alka-

lischen Filtrat mit n-Butanol ausgeschüttelt. Der Rückstand dieser Butanolausschüttelung gelangte als Rohsaponin - Fraktion zur DC - Analyse.

Zur Überprüfung, ob bei Trocknung oder Soxhlet - Extraktion das Glykosidspektrum Veränderungen erfährt, wurden in einigen Fällen jeweils 50 g Frischdroge grob zerkleinert und mit je 200 ml Methanol 48 Std. lang bei Zimmertemperatur mazeriert. Die Gewinnung der Rohsaponin - Fraktion aus dem Methanolauszug erfolgte in analoger Weise. Unterschiede in der Glykosidführung konnten nicht festgestellt werden.

Die durchgeführten Analysen ergaben, daß auch in den anderen oberirdischen Organen Yamogenin nativ in Form von Furostanolglykosiden vorliegt. In Tabelle 11 ist das typische Furostanolglykosidspektrum am Beispiel des natürlichen Wuchsortes

Tabelle 11: Die Furostanolsaponinführung der oberirdischen Organe von Pflanzen des Wuchsortes "Schweinsberger Moor" (hR_f - Werte s. Tab. 7, S. 65)

	Blatt	Stengel	Blüte	Frucht	
				unreif	reif
Furostanolglykosid x	-	-	-	++	++
Solayamocinosid A	++++	++++	++++	++++	+++
Solayamocinosid B	++	+++	+++	+++	+++
Solayamocinosid C	+++	+	+	+	+
Solayamocinosid D	++	-	+	-	-
Solayamocinosid E	+	-	(+)	-	-
Solayamocinosid F	+++	-	+	-	-

"Schweinsberger Moor" zusammengefaßt. Als Hauptglykoside führen die Stengel, Blüten, unreifen und reifen Früchte die Solayamocinoside A und B, während das in den Blättern daneben als Hauptkomponente auftretende Solayamocinosid C hier nur in Spuren gebildet wird. Die Früchte - auch die der anderen untersuchten Standorte - weisen unabhängig vom Reifegrad daneben ein zusätzliches Furostanolglykosid auf (hR_f = 54; Rotfärbung mit EHRLICH'S Reagenz), das in den anderen Organen nicht nachgewiesen werden konnte. Die im Blatt auftretenden Solayamocinoside D, E und F, die am C-3 des Aglykons ein Penta- bzw. Hexasaccharid gebunden haben (s. Tab. 7, S. 65), wurden bei Pflanzen der Herkunft "Schweinsberger Moor" nur noch in den Blüten nachgewiesen. Bei Pflanzen der Herkünfte 4, 5, 6 und 8 (s. Tab. 2, S. 19) konnten sie in Spuren jedoch auch in den anderen Organen gefunden werden.

VIII. Diskussion der Ergebnisse

Aus Pflanzen der Tomatidenol - Sippe von S. dulcamara ist neben dem Steroidalkaloid Tomatidenol verschiedentlich das sauerstoffanaloge Spirostanol Yamogenin isoliert worden (Literatur s. Einleitung). Dabei war bekannt, daß dieses in der Pflanze stets glykosidisch gebunden vorliegt, ohne daß Aussagen über die Art und die Anzahl dieser Yamogeninglykoside gemacht werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, daß Yamogenin in S. dulcamara nativ in Form von bisdesmosidischen Furostanolglykosiden mit Δ^5-Furosten-3β,

22α,26-triol als Aglykon vorliegt, das nach Abspaltung des Zuckers an C-26 spontan zum Spiroketal des Yamogenins cyclisiert.

Das Vorkommen solcher in der Seitenkette nicht cyclisierter bisdesmosidischer Verbindungen in der Natur hatten schon MARKER u. LOPEZ (1947) postuliert, doch blieb ihre Existenz fraglich, bis es 1967 TSCHESCHE, LÜDKE und WULFF gelang, aus den Wurzeln von Smilax aristolochiaefolia das erste neutrale, an C-22 hydroxylierte bisdesmosidische Saponin mit Furostanolstruktur zu isolieren, dem sie die Bezeichnung Sarsaparillosid gaben. Gegenüber der üblichen Nomenklatur der Saponine mit der Endung -in haben die Autoren zur Charakterisierung dieses neuen Saponintyps somit die Endung -osid an den Namen des stabileren, daraus durch Seitenkettencyclisierung hervorgehenden Spirostanolglykosides gewählt (TSCHESCHE und Mitarb., 1969a). Durch diese Namensgebung soll der Vorstufencharakter dieser Glykoside für die entsprechenden Spirostanolglykoside angedeutet werden, wie er heute auch im Biosyntheseweg postuliert wird (s. S. 9 ff bzw. Abb. 2, S. 10). Aus dem gleichen Grund schlagen japanische Autoren die Kennzeichnung dieser Furostanolglykoside durch die Vorsilbe Proto- vor den Namen der daraus hervorgehenden monodesmosidischen Spirostanolsaponine vor (KIYOSAWA und Mitarb., 1968). Bis heute sind etwa 25 Saponine vom bisdesmosidischen Furostanoltyp in ihrer Struktur bekannt.

Die in S. dulcamara nachgewiesenen, nach Hydrolyse Yamogenin liefernden und bisher nicht bekannten Furostanolglykoside

wurden der Nomenklatur von TSCHESCHE und Mitarb. (1969a) folgend als Solayamocinoside bezeichnet. In den Blättern sind sechs solcher Solayamocinoside vorhanden, die entsprechend ihrer Laufhöhe mit den Buchstaben A bis F bezeichnet wurden. In Spuren auftretende, sie begleitende Solayamocine dürfen als bei den Isolierungsverfahren entstandene Artefakte angesehen werden, da sie bei schonender Mazerierung von Frischpflanzen nicht nachgewiesen werden konnten.

Von den sechs Furostanolglykosiden traten im Blatt die Solayamocinoside A und C als Hauptkomponenten auf. Diese konnten isoliert und in ihrer Konstitution aufgeklärt werden. Bei Solayamocinosid A handelt es sich um ein bisdesmosidisches Δ^5-Furosten-3β,22α,26-triol - Glykosid, das wie alle bisher bekannten Furostanolglykoside an C-26 Glucose in β-glykosidischer Bindung aufweist und an C-3 das Tetrasaccharid [Arabinopyranosyl-(1→2)]-[β-galactopyranosyl-(1→3)]-[β-galactopyranosyl-(1→4)]-rhamnopyranose enthält (s. Abb. 32, S. 83).

Solayamocinosid C hat im Unterschied dazu an C-3 das Trisaccharid β-Galactopyranosyl-(1→2)-glucopyranosyl-(1→6)-glucopyranose gebunden (s. Abb. 34, S. 88).

Von den anderen Solayamocinosiden wurden die Zucker an C-3 qualitativ identifiziert und ihr molares Verhältnis nach der hierfür besonders gut geeigneten Methode der gaschromatographischen Analyse ihrer Alditolacetate bestimmt (JANSSON und Mitarb., 1976). Als Zucker wurden auch hier lediglich Glucose, Galactose, Rhamnose und Arabinose gefunden. Aus der Laufhöhe bei der DC - Trennung kann geschlossen werden, daß es sich

bei Solayamocinosid B um ein Trisaccharid handelt (1 Mol Glucose, 2 Mol Rhamnose), während die Solayamocinoside D und E an C-3 fünf Zucker und Solayamocinosid F sechs Zucker aufweisen (s. Tab. 7, S. 65).

Aus der Familie der Solanaceae sind Furostanolglykoside bisher nur aus Samen von Lycopersicum esculentum (SATO u. SAKAMURA, 1973) sowie Capsicum annuum (TSCHESCHE u. GUTWINSKI, 1975) isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt worden. Als Aglykon treten hier nach Hydrolyse Neotigogenin bzw. Gitogenin auf. Das Capsicosid genannte Furostanolsaponin besitzt an C-3 ein Pentasaccharid aus 4 Mol Glucose und 1 Mol Galactose und entspricht damit in der molaren Zusammensetzung dem Zucker an C-3 von Solayamocinosid E (s. Tab. 7, S. 65). Das aus Tomatensamen isolierte Furostanolsaponin hat an C-3 ein lineares Trisaccharid aus 2 Mol Glucose und 1 Mol Galactose gebunden, wobei die Galactose geninständig ist (s. Abb. 3, S. 12). Seine molare Zusammensetzung entspricht damit dem Zucker von Solayamocin C, doch ist das Trisaccharid hier über die Glucose am Aglykon gebunden (s. Abb. 34, S. 88).

Ein Yamogeninglykosid ist bisher nur von BOGACHEVA und Mitarb. (1976) aus Samen von Trigonella foenum - graecum isoliert und identifiziert worden. Es liegt dort nativ ebenfalls als Furostanolglykosid vor und hat an C-3 ein Trisaccharid aus 2 Mol Rhamnose und 1 Mol Glucose gebunden, das in seiner Struktur der Chacotriose (s. Abb. 5, S. 16) entspricht. Ein Trisaccharid mit dieser Zusammensetzung trägt auch das Solayamocinosid B an C-3, sodaß nicht auszuschließen ist, daß dieses Furostanol-

glykosid mit dem in Trigonella - Samen vorkommenden Glykosid identisch ist. Hinzu kommt, daß die Chacotriose als Zucker am C-3 des N-analogen Spirosolanols Tomatidenol in dieser Sippe von S. dulcamara vorkommt (β-Solamarin, s. Tab. 1, S. 17).

Die bei den neutralen Steroidsaponinen gefundenen Monosaccharide Glucose, Galactose, Rhamnose und Arabinose sind auch am Aufbau der Zuckerketten der in S. dulcamara gleichzeitig vorkommenden basischen Steroidsaponine beteiligt, wobei hier zusätzlich noch Xylose gefunden worden ist (SCHREIBER, 1958; SANDER und Mitarb., 1962; BOGNAR u. MAKLEIT, 1965; s. auch Tab. 1, S. 17). Bei den neutralen Steroidsaponinen ist jedoch - vielleicht mit Ausnahme von Solayamocinosid B - sowohl das molare Verhältnis der Zucker als auch die Verknüpfung der Monomeren innerhalb der Zuckerketten anders als bei den basischen Steroidsaponinen der Tomatidenol - Sippe von S. dulcamara. Steroidalkaloidglykoside mit fünf oder sechs Zuckern am C-3 sind hier nicht bekannt, ebenfalls nicht solche mit geninständiger Rhamnose (s. S. 15 ff). Dies deutet darauf hin, daß die ersten, von Cholesterol ausgehenden gemeinsamen Biosyntheseschritte der Spirostanole und Spirosolanole (s. Abb. 2 und 4, S. 10 und 14) nicht in glykosidischer Bindung erfolgen.

Solayamocinosid A ist auch in den Stengeln, Blüten, unreifen und reifen Früchten der Tomatidenol - Sippe das dominierende neutrale Steroidsaponin. Im Unterschied zu den Blättern treten hier jedoch in der Regel nicht sechs, sondern nur jeweils

zwei bis drei Furostanolglykoside auf, wobei Solayamocinosid B und nicht C die zweite Hauptkomponente bildet (s. Tab. 11, S. 90). Die Früchte unterscheiden sich in ihrer Glykosidführung von den übrigen oberirdischen Organen darüber hinaus durch das zusätzliche Auftreten eines Furostanolglykosides mit einem höheren R_f - Wert als Solayamocinosid A.

Basierend auf dem ermittelten Yamogeningehalt (s. Abb. 9, S. 30) ergibt sich für S. dulcamara ein auf das Trockengewicht bezogener Solayamocinosid - Gehalt von etwa 1,5 %.

Die isolierten Solayamocinoside weisen einen stark bitteren Geschmack auf. Diese Eigenschaft von Furostanolglykosiden ist erstmals für die von SATO u. SAKAMURA (1973) aus Tomatensamen isolierten Verbindungen dieses Typs angegeben und später auch für die Furostanolglykoside des Spargels beschrieben worden (KAWANO und Mitarb., 1975). Die identifizierten Solayamocinoside sind deshalb als das bittere Prinzip des "Bittersüßen Nachtschattens" anzusehen.

E. Zusammenfassung

1. In der heimischen Solanum dulcamara L. wird erstmals das Vorkommen von Furostanolglykosiden nachgewiesen. Das aus den Blättern der Tomatidenol - Sippe isolierte Spirostanol Yamogenin liegt nativ in Form von 6 bisdesmosidischen, Ring F - offenen Furostanolglykosiden vor, die als Solayamocinoside A bis F bezeichnet wurden.

2. Hauptkomponente des Steroidglykosidgemisches ist Solayamocinosid A, das isoliert und in seiner Konstitution aufgeklärt wurde. Es handelt sich bei diesem Glykosid um ein 3-O-{[Arabinopyranosyl-(1→2)]-[β-galactopyranosyl-(1→3)]-[β-galactopyranosyl-(1→4)]-rhamnopyranosyl}-3β,22α,26β-triol-25S-furost-5-en-26β-glucopyranosid (s. Abb. 32, S. 83).
Die Struktur des genuinen Aglykons als Δ^5-Furosten-3β, 22α,26-triol wurde durch oxidative Spaltung des Glykosides nach Art eines MARKER - Abbaues und Identifizierung der Spaltprodukte als $\Delta^{5,16}$- Pregnadienolonglykosid und γ-Methyl-δ-hydroxy-valeriansäureglucosid über Schmp., spez. Drehung, IR -, UV - und Massenspektren bewiesen.

   Die Identifizierung der Zucker erfolgte durch DC - Analyse und nach Überführung in die Oximsilylderivate sowie Alditolacetate durch GC - Analyse.

   Die Struktur der Zuckerkette an C-3 wurde durch Methy-

lierungsanalyse des Glykosides und der nach Partialhydrolyse und enzymatischer Spaltung erhaltenen Glykoside mit verkürzter Zuckerkette ermittelt. Die Identifizierung der hierbei anfallenden partiell methylierten Zucker erfolgte durch GC - und GC - MS - Analyse ihrer Alditolacetate.

3. Die zweite Hauptkomponente des Glykosidgemisches der Blätter ist Solayamocinosid C. Auch dieses Glykosid konnte isoliert und seine Konstitution aufgeklärt werden. Es handelt sich um ein 3-O-[β-Galactopyranosyl-(1→2)-glucopyranosyl-(1→6)-glucopyranosyl]-3β,22α,26β-triol-25S-furost-5-en-26β-glucopyranosid.

4. Die anderen vier bisdesmosidischen Solayamocinoside haben an C-26 ebenfalls Glucose gebunden. Solayamocinosid B trägt an C-3 ein Trisaccharid, bestehend aus 1 Mol Glucose und 2 Mol Rhamnose; die Solayamocinoside D und E haben jeweils ein Pentasaccharid, bestehend aus 2 Mol Glucose, 2 Mol Rhamnose und 1 Mol Galactose bzw. 4 Mol Glucose und 1 Mol Galactose gebunden; Solayamocinosid F weist an C-3 ein Hexasaccharid auf, das aus 4 Mol Glucose, 1 Mol Rhamnose und 1 Mol Arabinose besteht. Eine Sequenzanalyse dieser Zuckerketten wurde nicht durchgeführt.

5. Die Solayamocinoside besitzen einen stark bitteren Geschmack. Sie sind als das bittere Prinzip des

"Bittersüßen Nachtschattens", Solanum dulcamara L. anzusehen.

6. Nach der relativ leicht erfolgenden Abspaltung der Glucose von C-26 cyclisiert die Seitenkette der Solayamocinoside spontan zum Spiroketal des Yamogenins. Die daraus hervorgehenden entsprechenden Yamogeninglykoside wurden als Solayamocine A bis F bezeichnet.

7. Auch in den Stengeln, Blüten, unreifen und reifen Früchten der Tomatidenol - Sippe von S. dulcamara liegt Yamogenin nativ in Form der bisdesmosidischen Furostanolglykoside vor. Hauptkomponenten sind hier die Solayamocinoside A und B, während Solayamocinosid C in diesen Organen nur in Spuren auftritt. Die Früchte weisen unabhängig vom Reifegrad darüber hinaus ein zusätzliches Furostanolglykosid auf (s. Tab. 11, S. 90).

8. Die genannten Solayamocinoside wurden in den oberirdischen Organen von Tomatidenol - Pflanzen 10 verschiedener natürlicher Wuchsorte durch DC - Analyse nachgewiesen. Unterschiede in der Glykosidführung der Pflanzen verschiedener Herkünfte treten praktisch nur in quantitativer Hinsicht auf.

9. Der Yamogeningehalt der oberirdischen Organe von S. dulcamara verschiedener natürlicher Wuchsorte wurde photometrisch unter Anwendung der Farbreaktion mit Antimon(III)-chlorid in Perchlorsäure und z.T. auch

gaschromatographisch ermittelt. In einigen Fällen wurde gleichzeitig der Gehalt des daneben vorkommenden N-analogen Tomatidenols photometrisch mit dem Reagenz nach CLARKE (Paraformaldehyd/Phosphorsäure) bestimmt.

In Blättern von Pflanzen 10 verschiedener natürlicher Wuchsorte wurde ein Yamogeningehalt von 0,36 - 0,68 % ermittelt. Zur Blütezeit der Pflanzen ist in diesem Organ ein mittlerer Yamogeningehalt von 0,55 % zu erwarten. Eine ähnliche Variationsbreite im Yamogeningehalt von Pflanzen verschiedener Wildstandorte wurde auch bei den anderen oberirdischen Organen gefunden (s. Tab. 4, S. 28). Einjährige Stengel weisen einen mittleren Yamogeningehalt von 0,47 %, Blüten von 0,61 % und Früchte je nach Entwicklungszustand von 0,31 - 0,43 % auf (s. Abb. 9, S. 30).

10. Der Yamogeningehalt der Blätter erreicht im Juli, d.h. zum Zeitpunkt des Blühens und Fruchtens der Pflanzen, sein Maximum. Anders als bei dem N-analogen Tomatidenol findet im weiteren Vegetationsverlauf keine Abnahme des Yamogeningehaltes statt (s. Abb. 10, S. 33).

11. Die tiefer inserierten, älteren Blätter weisen auf das Trockengewicht bezogen einen höheren Yamogeningehalt auf als die jüngeren Blätter der Spitzenregion (s. Tab. 5, S. 35).

12. Reife, rote Früchte führen auf das Trockengewicht bezogen signifikant mehr Spirostanole als unreife, grüne Früchte (s. Tab. 4, S. 28 und Abb. 9, S. 30).

13. In Blättern blühender und fruchtender Pflanzen dominiert das neutrale Steroidsapogenin Yamogenin vor dem biosynthetisch verwandten N-analogen Tomatidenol (s. Abb. 10, S. 33 bzw. Tab. 5, S. 35). Mehrjährige, verholzte Stengel, die als "Stipites Dulcamarae" pharmazeutisch verwendet werden, führen dagegen mehr Tomatidenol als Yamogenin (s. Abb. 11, S. 36).

14. Aus der von den bekannten Tomatidenolglykosiden abweichenden Zuckerkettenstruktur bei den isolierten neutralen Steroidsaponinen kann geschlossen werden, daß die ersten, von Cholesterin ausgehenden gemeinsamen Biosyntheseschritte der Spirosolanole und Spirostanole nicht in glykosidischer Bindung erfolgen.

F. Material und Methoden

I. Herkunft, Ernte, Trocknung und Lagerung des Untersuchungsmaterials

S. dulcamara - Pflanzen der Tomatidenol - Sippe wurden 1977 und 1978 von 10 verschiedenen natürlichen Wuchsorten in den Monaten Juni bis August geerntet. Die Untersuchungen über den Yamogeningehalt im Verlaufe der Vegetationsperiode wurden an einem auf dem Versuchsfeld des Institutes für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf kultivierten Klon des Wildstandortes 1 durchgeführt*(s. Tab. 2, S. 19). Analysiert wurden die voneinander getrennten oberirdischen Organe. Die Trocknung erfolgte im Trockenschrank bei 50°C; der Trocknungsverlust der Blätter betrug ca. 85 %.

Bis zur Extraktion lagerte die Droge maximal sechs Monate in pergamentierten Papiertüten bei - 20°C. Die verschiedenen Extrakte wurden bis zur Aufarbeitung bei - 20°C unter Stickstoff aufbewahrt.

Die analysierte Handelsdroge "Stipites Dulcamarae" wurde von der Fa. CAESAR & LORETZ, Hilden bezogen.

II. Bestimmung der Steroidalkaloid - Sippe

Die Bestimmung der Zugehörigkeit der eingesammelten Pflanzen zu den bekannten chemischen Sippen von S. dulcamara erfolgte

---

* Herrn Reviergärtner W. ROGMANN, Botanischer Garten der Universität Düsseldorf, danke ich für den Anbau und die Pflege der Klonpflanzen.

nach WILLUHN (1966a). Es wurde von jeweils 1,0 g der getrockneten und grob gepulverten Pflanzenorgane ausgegangen. Zum Vorquellen wurden sie 5 Min. lang mit 2 ml Wasser stehen gelassen und dann mit Methanol im Soxhlet - Verfahren erschöpfend extrahiert. Aus dem eingeengten, mit Wasser versetzten Methanolextrakt wurden die basischen Steroidglykoside mit konz. Ammoniaklösung bei pH 9 - 10 und 70°C ausgefällt. Der Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt, getrocknet und 20 Min. lang mit 96 %-igem Äthanol ausgekocht. Ein Teil der filtrierten Lösung wurde auf einer Tüpfelplatte eingedampft und mit 0,03 %-iger Paraformaldehydlösung in Phosphorsäure (Reagenz nach CLARKE, 1958; modifiziert nach SCHREIBER und Mitarb., 1961) auf ungesättigte Glykoside geprüft.
Der restliche Teil des Filtrates wurde 4 Std. lang mit 2n methanolischer Salzsäure hydrolysiert, mit Ionenaustauscher neutralisiert und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die erhaltenen Aglyka wurden dc analysiert.
Zum dc Nachweis von Yamogenin wurde jeweils 1 g der getrockneten und voneinander getrennten, oberirdischen Organe mit Methanol 20 Std. lang im Soxhlet extrahiert und der Extrakt mit 30 ml 2n methanolischer HCl 4 Std. lang am Rückfluß hydrolysiert. Nach Neutralisation mit 2 %-iger NaOH und intensivem Ausschütteln mit Chloroform (5 x 30 ml) gelangte die jeweilige Chloroform - Ausschüttelung zur DC - Analyse.

III. Spektroskopische Methoden

Die Aufnahme der UV - Spektren erfolgte mit dem Gitterspektralphotometer Typ DB-G der Fa. BECKMAN bzw. mit dem

PM Q II der Fa. ZEISS bei 20°C in Äthanol p.a.. Die IR - Spektren wurden mit dem Spektralphotometer 257 der Fa. PERKIN-ELMER aufgenommen. Die Untersuchung der Substanzen erfolgte in KBr - Preßlingen und in Ausnahmefällen in Chloroform (Uvasol). Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer Typ VARIAN MAT 311 A im Institut für Organische Chemie sowie mit dem Typ CH 7 A der Fa. VARIAN im Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf aufgenommen. Die Spektren wurden bei 70 eV vermessen.

IV. Bestimmung physikalischer Konstanten

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch Typ 350 der Fa. LEITZ bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert. Die Bestimmung der spezifischen Drehung erfolgte mit dem Polarimeter Typ 243 der Fa. PERKIN-ELMER bei 20°C.

V. Chromatographische Methoden

1. Dünnschichtchromatographie

1.1. Analytische Dünnschichtchromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten der Fa. MERCK verwendet. Die Chromatographie wurde in der Regel über eine Laufstrecke von 10 cm bei Kammersättigung durchgeführt.

1.2. Präparative Dünnschichtchromatographie

Zur präparativen Trennung geringer Substanzmengen bzw. deren Reinigung wurden Aluminium-Fertigplatten mit Kieselgel 60 F_{254}

(Fa. MERCK) verwendet. Hier wurden pro Platte ca. 8 mg Substanz mit dem DESAGA - Mikrodoser nach DIBBERN aufgetragen. Nach dem Entwickeln der Platten wurde eine Referenzspur herausgeschnitten und detektiert. Danach wurden die Folien wieder zusammengesetzt, die Substanzzone mit Bleistift markiert und ausgeschnitten. Die Elution der Substanzen vom Adsorbens erfolgte durch langsames Übertropfen eines geeigneten Elutionsmittels über die herausgeschnittenen Streifen. Das Elutionsmittel wurde im Rotavapor abgezogen, der Rückstand in wenig Lösungsmittel aufgenommen und zur Abtrennung letzter Adsorbenspartikel durch eine Filterspritze gegeben (vgl. DIBBERN und Mitarb., 1971).

1.3. Dünnschichtchromatographische Trennsysteme und Detektionsverfahren

1.3.1. Neutrale Steroidsaponine

System 1: n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v)
(DRAGALIN u. KINTYA, 1975)

System 2: Chloroform/Methanol/Wasser (65v/35v/10v)
(KAWASAKI und Mitarb., 1974)

System 3: Chloroform/Methanol/Wasser (61v/32v/7v)

Zur Detektion der neutralen Steroidsaponine wurden folgende Sprühreagenzien herangezogen:

a) EHRLICH'S Reagenz (STAHL, 1962; HEACOCK u. MAHON, 1965)
1 g p-Dimethylaminobenzaldehyd + 75 ml Methanol + 25 ml 36 %-ige Salzsäure. Nach dem Besprühen wird bis zur guten Farbdifferenzierung 5-10 Min. lang auf ca. 110°C erwärmt.

b) Anisaldehyd - Schwefelsäure (STAHL, 1962)

1 ml Anisaldehyd + 97 ml Eisessig + 2 ml konz. Schwefelsäure. Nach dem Besprühen wird bis zur guten Farbdifferenzierung 5-10 Min. lang auf ca. 110°C erwärmt.

c) Schwefelsäure p.a.

Zur Verkohlung der organischen Komponenten werden die DC - Platten nach dem Besprühen 15-30 Min. lang auf 150°C erhitzt.

1.3.2. Basische Steroidsaponine

System 1: Äthylacetat/Pyridin/Wasser (3v/1v/3v, Epiphase)
(BOLL, 1962)

Die Detektion erfolgte mit Anisaldehyd - Schwefelsäure und DRAGENDORFF'S Reagenz.

DRAGENDORFF'S Reagenz (THIES u. REUTHER, 1954)

2,6 g basisches Wismutcarbonat, 7 g Natriumjodid und 25 ml Eisessig werden einige Min. gekocht. Nach 12 Std. wird die Lösung filtriert. 20 ml Filtrat werden mit 80 ml Äthylacetat gemischt und o,5 ml Wasser zugegeben (= Vorratslösung).
10 ml Vorratslösung werden mit 100 ml Eisessig und 240 ml Äthylacetat vermischt. Alkaloide und andere N-haltige Verbindungen färben sich orangerot.

1.3.3. Basische und neutrale Aglyka

System 1: n-Hexan/Aceton (8v/2v)(JAIN, 1976)

System 2: Chloroform/Äther/Essigsäure (97v/2,5v/0,5v)
Schicht: Kieselgel G, imprägniert mit ca. 8 % Silbernitrat und 20 Min. lang bei 110°C aktiviert
(RÖNSCH u. SCHREIBER, 1967; DAWIDAR und Mitarb., 1973)

System 3: Äthylacetat/Cyclohexan (7v/3v)
(SANDER u. WILLUHN, 1961)

Die Detektion erfolgte mit Anisaldehyd - Schwefelsäure und bei den Steroidalkaloiden zusätzlich mit DRAGENDORFF'S Reagenz.

1.3.4. Zucker

System 1: n-Butanol/Aceton/Phosphatpuffer pH 5 (4v/5v/1v)
Schicht: Kieselgur (WALDI, 1965)

System 2: n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4v/1v/1v)

Besprüht wurde mit Anilinphthalat - oder p-Anisidin - Reagenz.

Anilinphthalat - Reagenz (STAHL, 1962)

0,93 g Anilin + 1,66 g o-Phthalsäure + 97,5 ml wassergesättigtes n-Butanol. Nach dem Besprühen wird 10 Min. auf 110°C erwärmt.

p-Anisidin - Reagenz (PETRE und Mitarb., 1976)

3 g p-Anisidinhydrochlorid (MERCK) + 97 ml wassergesättigtes n-Butanol. Nach dem Besprühen wird bis zur guten Farbdifferenzierung 5-10 Min. lang auf ca. 110°C erwärmt.

2. Säulenchromatographie

Als Adsorbentien wurden Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie (MERCK) und Aluminiumoxid neutral (WOELM) verwendet. Die Füllung der Säulen erfolgte durch Einschlämmen des Adsorbens in das Elutionsmittel. Das zu trennende Substanzgemisch wurde entweder in wenig erwärmtem Elutionsmittel gelöst und aufgetropft oder auf etwas Adsorbens aufgezogen (1g/1g) trocken auf die Säule gegeben. Die fast trockene Oberfläche wurde mit Seesand abgedeckt.

3. Gaschromatographie

Verwendet wurden der Gaschromatograph F 22 in Kombination mit dem Schreiber Typ 56 und dem Integrator M-1 der Fa. PERKIN-ELMER sowie der Gaschromatograph Typ 5710A mit dem Schreiber 7123A der Fa. HEWLETT-PACKARD. Der Papiervorschub betrug jeweils 1cm/Min.. Als Trägergas diente gereinigter Stickstoff. Beide Geräte waren mit einem Flammenionisationsdetektor ausgerüstet.

3.1. Gaschromatographie der Zucker

3.1.1. Oximsilylderivate

Stahlsäule, Länge 2m, Innendurchmesser 2mm

Stationäre Phase: 3 % Silikongummi SE 30 auf Chromosorb W, AW-DMCS, 80-100 mesh

Säulentemperatur: 190°C isotherm

Strömungsgeschwindigkeit: 34 ml/Min.

Injektor- und Detektortemperatur: 230°C bzw. 270°C

Retentionszeit für Phenyl-β-D-glucopyranosid (innerer Standard, Fa. SIGMA): 21,8 Min.

Retentionszeiten der Oximsilyläther - Derivate von Arabinose 2,9 Min., Rhamnose 3,6 Min., Galactose 6,9 Min. und Glucose 7,4 Min.

3.1.2. Alditolacetate (SLONEKER, 1972)

Glassäule, Länge 2m, Innendurchmesser 3mm

Stationäre Phase: 3 % Silikonöl OV 225 auf Gaschrom Q, 100-120 mesh

Säulentemperatur: 190°C isotherm

Strömungsgeschwindigkeit: 40 ml/Min.
Injektor- und Detektortemperatur: 200°C bzw. 250°C
Retentionszeiten von Rhamnitolacetat 7,3 Min., Arabinitolacetat 9,9 Min., Xylitolacetat 12,9 Min., Galactitolacetat 29,6 Min. und Glucitolacetat 33,5 Min.

3.1.3. Partiell methylierte Alditolacetate (JANSSON und Mitarb., 1976)

System 1: Säule OV 225 (wie bei den Alditolacetaten angegeben)
Säulentemperatur: 170°C isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 25 ml/Min.
Injektor- und Detektortemperatur: 200°C bzw. 250°C
Retentionszeit der Bezugssubstanz 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol (Fa. SIGMA): 14,0 Min.
Relative Retentionszeiten bezogen auf die Bezugssubstanz: 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylrhamnitol 0,35, 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylarabinitol 0,54, 1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4-di-O-methylrhamnitol 0,85, 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactitol 1,15, Penta-O-acetylrhamnitol 1,85.

System 2: Stahlsäule, Länge 2m, Innendurchmesser 3mm
Stationäre Phase: 1 % Kopolymerisat aus Äthylenglykolsuccinat und Cyanoäthylsilikon ECNSS-M auf Chromosorb G, AW-DMCS, 100-120 mesh
Strömungsgeschwindigkeit: 40 ml/Min.
Injektor- und Detektortemperatur: 200°C bzw. 250°C
Retentionszeit der Bezugssubstanz 1,5-Di-O-acetyl-

2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol: 9,7 Min.

Relative Retentionszeiten bezogen auf die Bezugssubstanz: 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylrhamnitol 0,73, 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactitol 1,24, Penta-O-acetylrhamnitol 2,13.

VI. Derivatisierungen

1. Acetylierung

Die zur Identifizierung von Yamogenin, Zuckern, Methylzuckern sowie zum Beweis der Furostanolstruktur herangezogenen Acetylderivate wurden in Anlehnung an KAWASAKI und Mitarb. (1974) hergestellt.

50 mg Substanz wurden in 5 ml einer Mischung aus Acetanhydrid und frisch über Phosphorpentoxid destilliertem Pyridin (1v/1v) gelöst, 1 Std. lang im Wasserbad erhitzt und dann über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Verdünnen des Reaktionsgemisches mit ca. 15 ml Wasser wurden die Acetate 5 mal mit jeweils 3 ml Chloroform p.a. ausgeschüttelt. Die über Natriumsulfat getrocknete Chloroformphase wurde im Vakuum abgezogen. Notwendige Reinigungen des Rückstandes wurden durch Umkristallisation oder DC an Kieselgel-Alufolien vorgenommen. Im Falle der Zucker wurde von der zehnfachen Menge Acetylierungsgemisch ausgegangen.

2. Permethylierung der Steroidglykoside

Die Permethylierung der Glykoside erfolgte in Anlehnung an JANSSON und Mitarb. (1976) mit dem von HAKOMORI (1964) be-

schriebenen Dimsyl-Natrium-Reagenz.

2.1. Herstellung des Reagenzes

5,0 g Natriumhydrid (20 %-ige Paraffinöl-Suspension; Fa. MERCK) wurden gründlich durch mehrmaliges Suspendieren in trockenem Petroläther (40-60°C) und Abgießen der klaren Flüssigkeit gewaschen und unter strömendem Stickstoff getrocknet. In das Reaktionsgefäß wurden 50 ml molekularsiebgetrocknetes Dimethylsulfoxid gegeben. Das Gefäß wurde mit einem Septum verschlossen und mit Stickstoff über 2 Injektionsnadeln begast. Nach vierstündiger Ultraschallbad - Behandlung endete die Wasserstoffentwicklung, und die resultierende graugrün opaleszierende Lösung von Natriummethylsulfinylmethanid (2m in DMSO) konnte zur Permethylierung eingesetzt werden. Das Reagenz ist im Kühlschrank ca. 4 Wochen haltbar.

2.2. Permethylierung und Hydrolyse

5 mg getrocknetes Glykosid wurden mit Hilfe eines Ultraschallbades in trockenem Dimethylsulfoxid vollständig unter fließendem Stickstoff gelöst, wobei das Reaktionsgefäß mit einem Septum verschlossen wurde. Die Lösung wurde mit 2,0 ml Dimsyl-Natrium-Reagenz tropfenweise über eine dritte Injektionsnadel versetzt, dann 30 Min. lang bei Raumtemperatur ultraschallbehandelt und über Nacht stehen gelassen. Danach wurde das Reaktionsgefäß in Eiswasser gekühlt und 2 ml Methyljodid über eine Spritze zugefügt. Entstehender Druck muß über eine Injektionsnadel entweichen können. Nach einstündiger Ultraschallbehandlung wurde überschüssiges Methyljodid im Rotavapor abdestilliert, wobei die Badtemperatur 40°C nicht überschreiten

darf. Die Lösung wurde nun in 8 ml Wasser gegossen und 5 mal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Dann wurde 40 Std. lang in 2 %-iger methanolischer HCl bei 70°C bzw. 16 Std. lang mit 0,13m H_2SO_4 bei 100°C hydrolysiert (s. S. 135 f). Die einzelnen Methylzucker wurden, wie bei 4. beschrieben, in die Alditolacetate überführt und durch GC - und GC - MS - Analyse identifiziert.

3. Oximbildung und Silylierung der Zucker

Zur Herstellung der Oximderivate wurden bei den Vergleichszuckern jeweils 50 mg nach ZÜRCHER und Mitarb. (1975) nach Äquilibrierung und vollständiger Entwässerung mit 200 mg Hydroxylaminhydrochlorid und 8 ml Pyridin versetzt und die Mischung 30 Min. lang auf 70-75°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurden 0,8 ml Hexamethyldisilazan und 0,8 ml Trimethylchlorsilan zugefügt und 60 Min. auf 75°C erwärmt. Nach Eindampfen des Reaktionsgemisches im Vakuum wurde der Rückstand in wenig wasserfreiem Benzol aufgenommen und zur Trockne gebracht; der Vorgang wurde 3 mal wiederholt (s. WULFF, 1965). Danach konnte die klare Benzollösung zur gc Bestimmung der Oximsilylzucker verwendet werden. Bei den aus den Glykosiden gewonnenen Zuckern wurde analog vorgegangen, wobei hier die Äquilibrierung entfiel.

4. Herstellung der Alditolacetate

Die Reduktion der Zucker wurde in Anlehnung an JANSSON und Mitarb. (1976) durchgeführt. 10 mg Zucker wurden in 4 ml Wasser gelöst und mit 80 mg Natriumborhydrid versetzt. Nach

2 Std. wurde die Lösung mit saurem Ionenaustauscher (Dowex 50) auf pH 3,5 gebracht, filtriert, im Vakuum eingedampft, Methanol zugesetzt und erneut destilliert. Die Methanoldestillation wurde 3 mal wiederholt. Die entstandenen Zuckeralkohole wurden sofort wie angegeben acetyliert.

VII. Isolierung von Yamogenin

400 g getrocknete und grob gemahlene Blattdroge der Herkunft "Schweinsberger Moor" wurden 60 Std. lang im Soxhlet erschöpfend extrahiert und der Rückstand (22,4 g) mit 400 ml 2n methanolischer Salzsäure 4 Std. lang am Rückfluß hydrolysiert. Das mit Natronlauge neutralisierte und auf etwa die Hälfte des Volumens eingeengte Hydrolysat wurde nach Zugabe des gleichen Volumens Wasser 10 mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Eindampfen der vereinigten organischen Phasen am Rotavapor resultierten 4,9 g einer hochviskosen, braunen Aglyka - Rohfraktion. 2,0 g dieser Fraktion wurden sc an 200 g Kieselgel 60 aufgetrennt. Eluiert wurde mit Petroläther und Petroläther/Äther - Gemischen mit allmählich steigendem Ätheranteil bis 50 %. Die 25 ml - Fraktionen wurden dc im Sapogenin-System 1 auf ihre Zusammensetzung untersucht und die saponinhaltigen Fraktionen (R_f 0,42) vereinigt.
Der Rückstand (300 mg) wurde in 2,0 ml Äther/Aceton (1v/1v) gelöst und an 20 Kieselgel G - Folien (MERCK) in demselben Fließmittelsystem präparativ gereinigt. Die Yamogeninzone wurde mit Äthylacetat eluiert. Nach dem Trocknen des Rückstandes über Phosphorpentoxid verblieben 120 mg dc einheitliche, weiße Substanz, die den Analysen zugeführt wurde.

Acetylierung von Yamogenin:

50 mg Yamogenin wurden im Wasserbad mit 5 ml Acetanhydrid/Pyridin (1v/1v) 1 Std. lang erhitzt und über Nacht stehen gelassen (KAWASAKI und Mitarb., 1974). Nach Verdünnen des Reaktionsgemisches mit ca. 15 ml Wasser wurde 5 mal mit 30 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die über Natriumsulfat getrocknete Chloroformphase wurde im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde durch zweimalige Umkristallisation aus Methanol/Chloroform (9v/1v) gereinigt und die in beiden Sapogenin - Systemen mit Yamogeninacetat identische Substanz analysiert.

VIII. Quantitative Bestimmung von Yamogenin

1. Photometrische Gehaltsbestimmung

1.1. Methode

Die photometrische Gehaltsbestimmung erfolgte nach SOFOWORA u. HARDMAN (1974) durch Extinktionsmessung der Färbung nach Zugabe von Antimon(III)-chlorid/Perchlorsäure. Die auftretende Färbung soll 10 Min. nach Reagenzzugabe gemessen werden. Als Nachteil dieser Methode muß angesehen werden, daß auch zum Zeitpunkt der Messung kein stabiles Extinktionsplateau existiert (s. Abb. 35). Da aber andere vergleichbare photometrische Bestimmungsmethoden dieser Stoffgruppe (z.B. OKANISHI u. TOGAMI, 1969; SANCHEZ und Mitarb., 1972) ebenfalls diesen Nachteil aufweisen und die Bestimmungsmethode nach SOFOWORA u. HARDMAN (1974) unter exakt eingehaltenen Bedin-

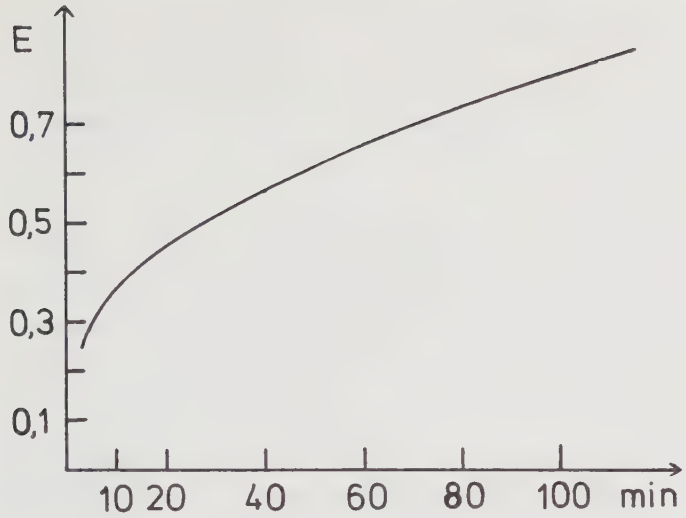


Abbildung 35: Änderung der Farbintensität in Abhängigkeit von der Zeit nach Reagenzzusatz, gemessen bei 498 nm (75 µg Yamogenin + 20 µl Chloroform/Äthanol = 1v/1v + 5,0 ml 25 % $SbCl_3$ in 60 %-iger Perchlorsäure)

gungen gut reproduzierbare Werte ergibt, gelangte diese Methode zur Anwendung.

Die getrockneten und grob gemahlenen Pflanzenorgane wurden mit Methanol 60 Std. lang erschöpfend im Soxhlet extrahiert. Der 1,0 g Droge entsprechende Teil des Methanolextraktes wurde eingedampft und mit 10 ml 2n methanolischer HCl 4 Std. lang am Rückfluß hydrolysiert. Dann wurde mit NaOH neutralisiert, auf etwa die Hälfte des Volumens eingeengt, das gleiche Volumen Wasser zugesetzt und 10 mal mit je 10 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Der Rückstand aus den vereinigten organischen Phasen

wurde zu 20,0 ml Chloroform p.a. gelöst (Meßkolben). Mit dem DESAGA - Mikrodoser wurden 0,2 ml dieser Lösung auf 2 Kieselgel 60 - Folien, 20 X 20 cm (MERCK) aufgetragen und präparativ im System n-Hexan/Aceton (8v/2v) aufgetrennt. In Höhe des mitchromatographierten und mit Anisaldehyd - Schwefelsäure detektierten authentischen Yamogenins wurden 2 Streifen ausgeschnitten und mit je 15 ml Chloroform/Methanol (8v/2v), wie bei der präparativen DC beschrieben (S. 104), mit dem Elutor eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in einem Schliffgläschen mit 20 µl einer Mischung aus Chloroform/Äthanol abs. (1v/1v) sowie 5,0 ml 25 % Antimon(III)-chlorid in 60 %-iger Perchlorsäure versetzt, mit einer Teflonkappe verschlossen und 2 Min. lang intensiv geschüttelt. Die Messung der aufgetretenen gelbroten Färbung erfolgte nach genau weiteren 8 Min. gegen das Reagenz bei 498 nm. Die Gehalte wurden einer Eichkurve entnommen. Es wurden jeweils 3 Bestimmungen durchgeführt und für die Gehaltsangaben gemittelt.

1.2. Erstellung der Eichkurve

Zur Aufstellung der Eichkurve wurden 1,0 mg des isolierten Yamogenins in einem Meßkölbchen zu 5,0 ml gelöst und jeweils 50, 125, 250, 375 und 500 µl dieser Lösung entsprechend 10, 25, 50, 75 und 100 µg in einem Schliffgläschen zur Trockne gebracht. Nach Reagenzzugabe wurde die Intensität der aufgetretenen Färbung bei 498 nm genau nach 10 Min. im Spektralphotometer gemessen. Es wurden für jede Konzentrationsstufe 2 Bestimmungen durchgeführt und der Mittelwert für die Eich-

kurve herangezogen. Die durchschnittliche Abweichung betrug $\pm$ 3 %. Die erhaltenen Extinktionswerte (s. Tab. 12) ergeben gegen die Yamogeninkonzentration aufgetragen eine Gerade.

Tabelle 12: Extinktionswerte (498 nm) der mit verschiedenen Yamogeninmengen 10 Min. nach Reagenzzugabe erhaltenen Farblösungen bei direkter Messung und nach Chromatographie über eine DC - Platte

µg Yamogenin	Extinktion		Differenz in %
	direkt	nach präp. DC	
10	0,106	0,096	9,5
25	0,174	0,165	5,2
50	0,276	0,258	6,2
75	0,365	0,358	2,0
100	0,485	0,452	6,8

Da bei der Yamogeninbestimmung aus der Droge Yamogenin nach Chromatographie über eine DC - Platte isoliert wird, wurden zur Aufstellung der Eichkurve die angegebenen Yamogeninmengen wie bei der Drogenanalyse mit dem DESAGA - Mikrodoser strichförmig auf eine DC - Platte aufgetragen, nach Entwicklung der Platte analog von der Platte eluiert und die erhaltenen Rückstände mit dem Reagenz versetzt. Die hierbei erhaltenen Extinktionswerte sind in Tab. 12 zusammengefaßt. Bedingt durch den bei

der präparativen Chromatographie auftretenden Isolationsverlust wurden um durchschnittlich 5,9 % erniedrigte Extinktionswerte erhalten. Um diesen Isolationsverlust zu eliminieren, wurde die hier erhaltene Gerade als Eichkurve für die quantitative Yamogeninbestimmung herangezogen (s. Abb. 36).

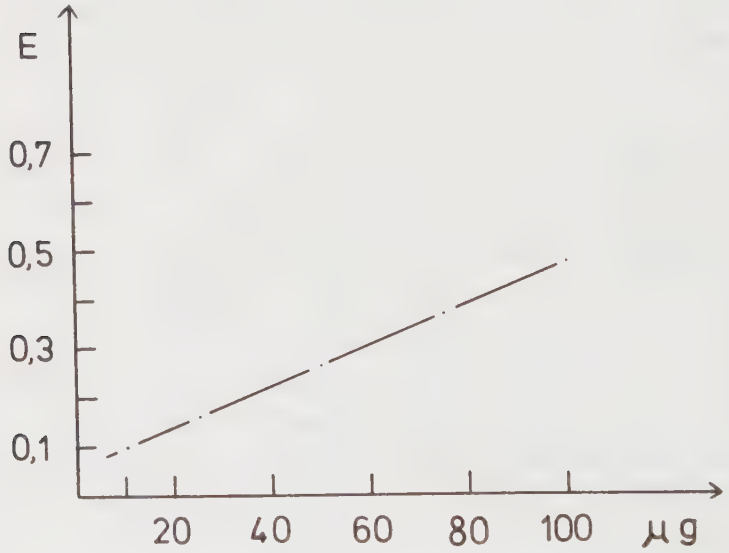


Abbildung 36: Eichkurve für die photometrische Gehaltsbestimmung von Yamogenin mit Antimon(III)-chlorid/Perchlorsäure

1.3. Bestimmung des methodischen Fehlers

Dem Methanolextrakt von 50,0 g Blattdroge der Herkunft "Schweinsberger Moor" wurden nach Ermittlung des Yamogeningehaltes 20,0 mg, 19,8 mg bzw. 21,1 mg Yamogenin zugefügt und

der Extrakt danach analog analysiert. Wird die zugefügte Menge an Yamogenin zusammen mit dem Ergebnis aus der Analyse ohne Yamogeninzusatz gleich 100 % gesetzt, so werden 96,7 %, 96,0 % und 97,3 % Yamogenin wiedergefunden. Der mittlere methodische Fehler beträgt danach 3,3 % (Relative Standardabweichung s_{rel} = 1,0 %; n = 3).

2. Gaschromatographische Gehaltsbestimmung

Wegen des beschriebenen Nachteils der photometrischen Bestimmungsmethoden erschien es angebracht, die erhaltenen Yamogenin - Gehaltswerte zumindest an einigen Beispielen mit einer anderen Methode zu überprüfen. Als einfache und schnell durchzuführende Methode bot sich hierfür die gc Bestimmung nach ROZANSKI (1972) an.

50,0 g getrocknete und grob zerkleinerte Droge wurden 60 Std. lang mit Methanol im Soxhlet erschöpfend extrahiert. Der 1,0 g Droge entsprechende Methanolextrakt wurde mit 10 ml 2n methanolischer HCl 4 Std. lang am Rückfluß hydrolysiert, mit NaOH neutralisiert und nach Verdünnen mit Wasser 10 mal mit je 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Der Rückstand der Chloroformausschüttelungen wurde im Meßkolben auf 20,0 ml gebracht. 0,2 ml dieser Lösung wurden, wie auf S. 104 beschrieben, durch präparative DC in n-Hexan/Aceton (8v/2v) und abweichend von der Methode nach ROZANSKI gereinigt. Der Rückstand des bei der präparativen DC angefallenen Eluats (Äthylacetat) wurde in 0,5 ml Xylol p.a. gelöst und mit 0,5 ml einer 0,1 %-igen

Cholestanollösung versetzt. 0,3 µl dieser Mischung wurden an einer SE 30 - Säule gc aufgetrennt.

GC - Bedingungen: Stahlsäule, Länge 2m, Innendurchmesser 3mm
Stationäre Phase: 3 % Silikongummi SE 30 auf Chromosorb W, AW-DMCS, 80-100 mesh
Säulentemperatur: 270°C isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml N_2/Min.
Injektor- und Detektortemperatur: 250°C bzw. 300°C
Retentionszeit für 5α-Cholestan-3β-ol 5,1 Min., Yamogenin 7,25 Min. (s. Abb. 37)

Abbildung 37: GC von Yamogenin und 5α-Cholestan-3β-ol als innerem Standard an 3 % SE 30

Die Bestimmung des Yamogeningehaltes erfolgte durch Korrelierung der Peakflächen von Cholestanol und Yamogenin im Standard- und Analysenchromatogramm. Der Yamogeningehalt der Droge in Prozent errechnet sich nach folgender Formel (DAB 7 - DDR):

$$\text{Yamogenin \% (g/g)} = \frac{F_1 \times F_4 \times EW_2 \times EW_3 \times 100}{F_3 \times F_2 \times EW_1 \times EW_4}$$

F_1 = Fläche des Cholestanolpeaks im Standardchromatogramm

F_2 = Fläche des Cholestanolpeaks im Analysenchromatogramm

F_3 = Fläche des Yamogeninpeaks im Standardchromatogramm

F_4 = Fläche des Yamogeninpeaks im Analysenchromatogramm

EW_1= Einwaage der Droge in mg

EW_2= Einwaage von Yamogenin im Analysenchromatogramm

EW_3= Einwaage von Cholestanol im Analysenchromatogramm

EW_4= Einwaage von Cholestanol im Standardchromatogramm.

Die Ergebnisse aus photometrischer und gaschromatographischer Bestimmung sind in Tabelle 13 gegenübergestellt.

Tabelle 13: Gegenüberstellung der photometrisch und gaschromatographisch ermittelten Yamogeningehalte bei oberirdischen Organen von S. dulcamara - Pflanzen verschiedener Herkünfte

Herkunft	Organ	Yamogeningehalt in % TG		
		photometrisch	gc	Diff.
St. Cappel	Blatt	0,40	0,40	-
Himmelgeist	Stengel	0,26	0,27	0,01
Himmelgeist	Blüte	1,05	0,83	- 0,22
Himmelgeist	Frucht grün	0,33	0,21	- 0,12
Himmelgeist	Frucht rot	0,37	0,32	- 0,05
Fa. CAELO	mehrjährige Stengel	0,18	0,22	0,04

IX. Quantitative Bestimmung von Tomatidenol

Die photometrische Tomatidenolbestimmung erfolgte nach WILLUHN (1967) mit Paraformaldehyd-H_3PO_4 (Reagenz nach CLARKE, 1958). Die Intensität der mit diesem Reagenz erzielten Blaufärbung folgt im Bereich von 10-200 µg pro ml Reagenzlösung dem Lambert - Beer'schen Gesetz. Das Extinktionsmaximum bei 601 nm ist 15-180 Min. nach Reagenzzugabe konstant und fällt dann ab. Es wurde jeweils von den Chloroformlösungen (20,0 ml) ausgegangen, die bereits zur Yamogeninbestimmung gedient hatten (s. S. 115). Jeweils 0,2 ml von dieser Lösung wurden an einer Kieselgel-Alufolie mit Äthylacetat/Cyclohexan (7v/3v) 2 mal über eine Laufstrecke von 15 cm aufgetrennt. Die Tomatidenolzone (R_f = 0,64) wurde ausgeschnitten, mit Chloroform/Methanol im Elutor eluiert und der Rückstand mit 5,0 ml 0,03 %-iger Paraformaldehydlösung in Phosphorsäure (CLARKE, 1958; modifiziert nach SCHREIBER und Mitarb., 1961) versetzt. Nach 40-50 Min. wurde die Extinktion der Blaufärbung bei 601 nm gegen das Reagenz gemessen und die der Extinktion entsprechende Tomatidenolmenge einer Eichkurve entnommen. Es wurden jeweils 3 Tomatidenolbestimmungen durchgeführt und gemittelt.

Zur Erstellung der Eichkurve wurde 1,0 mg Tomatidenol in einem Meßkölbchen zu 5,0 ml gelöst und jeweils 50, 125, 250, 375, 500, 750 µl sowie 1 ml dieser Lösung entsprechend 10, 25, 50, 75, 100, 150 und 200 µg in einem Schliffgläschen zur Trockne gebracht. Die Eichkurve wurde analog der Yamogeninbestimmung aufgestellt (s. S. 116). Als Mittelwerte aus 2 Bestimmungen

ergaben sich folgende Extinktionen:

10 µg = 0,044, 25 µg = 0,110, 50 µg = 0,213, 75 µg = 0,340, 1oo µg = 0,440, 150 µg = 0,523, 200 µg = 0,900.

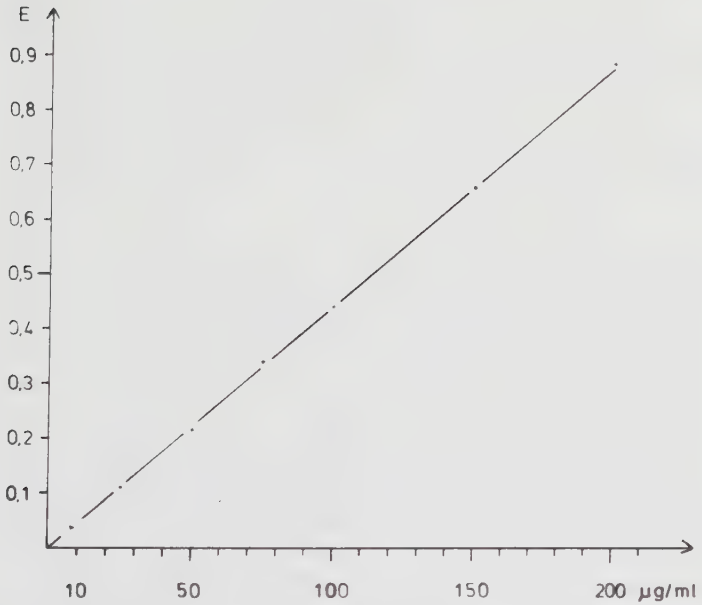


Abbildung 38: Eichkurve für die photometrische Gehaltsbestimmung von Tomatidenol mit Paraformaldehyd/Phosphorsäure

Bestimmung des methodischen Fehlers

Dem Methanolextrakt von 50,0 g Blattdroge der Herkunft "Schweinsberger Moor" wurden nach Ermittlung des Tomatidenolgehaltes 20,0 mg, 20,1 mg bzw. 20,2 mg Tomatidenol zugefügt und der Extrakt danach analysiert. Wird die zugefügte Menge an Tomatidenol zusammen mit dem Ergebnis aus der Analyse ohne Tomatidenolzusatz gleich 100 % gesetzt, so werden 94,5 %, 95,5 % und 96,4 % Tomatidenol wiedergefunden. Der mittlere methodische Fehler beträgt danach 4,1 % (Relative Standardabweichung s_{rel} = 1,24 %; n = 3).

X. Isolierung der neutralen Steroidsaponine

1. Gewinnung der Rohsaponin - Fraktion

4,70 kg getrocknete und pulverisierte Blätter von S. dulcamara-Pflanzen des Wuchsortes "Schweinsberger Moor" wurden im Soxhletverfahren 20 Std. lang mit Petroläther entfettet und anschließend mit Methanol 60 Std. lang erschöpfend ausgezogen. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum blieb ein zäher, brauner Rückstand zurück. Dieser wurde mit der ca. 80 % des Extraktgewichtes entsprechenden Menge Wasser versetzt und bei 60 - 70°C mit konz. Ammoniaklösung ein pH - Wert von 9 - 10 eingestellt. Die Lösung wurde von dem entstandenen öligen Niederschlag dekantiert, eingeengt, mit Wasser versetzt und 10 mal mit n-Butanol ausgeschüttelt. Die vereinigten und am Rotavapor eingedampften Butanolauszüge ergaben 263,2 g Rohsaponinextrakt; das entspricht 5,6 % des Drogen - Trockengewichtes.

Diese viskose, rotbraune Gesamtfraktion wurde nach Gefriertrocknung bei - 20°C unter Stickstoff aufbewahrt. In der Kälte bildete sie eine sehr harte, spröde, teilweise durchkristallisierte, trockene Masse, die bei Raumtemperatur wieder eine viskose Konsistenz annahm. Diese Rohsaponin - Gesamtfraktion wurde dc untersucht und danach sc aufgetrennt.

2. Reinigung der Rohsaponin - Fraktion am Ionenaustauscher sowie durch Ätherfällung

In Anlehnung an KAWANO und Mitarb. (1977) wurden 40,0 g der Rohsaponin - Fraktion in wenig Wasser in der Wärme gelöst und auf eine Säule mit 400 g Amberlite CG 50 Typ I (Fa. SIGMA) gegeben. Nach Elution mit 4 l 96 %-igem Äthanol waren im DC keine Saponine mehr nachweisbar. Auch durch Nachwaschen der Säule mit 1 l Wasser wurden keine Saponine mehr von der Säule eluiert. Das Eluat wurde auf ein Volumen von 400 ml eingeengt und die gerade noch klare Lösung mit dem fünffachen Volumen Äther versetzt. Die auftretende Saponinfällung (35,8 g) wurde sc weiter gereinigt, die Lösung nach dc Kontrolle verworfen.

3. Säulenchromatographische Fraktionierung der Rohsaponin - Fraktion

35,8 g der gereinigten Saponinfraktion wurden in wenig n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) aufgenommen und mit 40,0 g Kieselgel 60 für die SC (MERCK) versetzt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels am Rotavapor wurden die an Kieselgel adsorbierten Saponine in 8 gleiche Teile geteilt, auf 8 Säulen mit jeweils 500 g Kieselgel 60 aufgebracht und unter gleichen

Bedingungen mit n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) aufgetrennt. Die einzelnen 20 ml großen Fraktionen wurden im DC auf ihre Zusammensetzung untersucht und zu 6 Teilfraktionen vereinigt (s. Abb. 13, S. 47). Tabelle 14 gibt das Trennergebnis der Säulen wieder.

Tabelle 14: Säulenchromatographische Fraktionierung der Steroidsaponin - Gesamtfraktion an Kieselgel 60 mit n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) als Elutionsmittel (DC s. S. 47)

Fraktion	vereinigt zu Teilfraktion	Rückstand (g)	Zusammensetzung (DC)
1 - 41	-	-	-
42 - 72	I	3,48	Solayamocinosid A, B
73 - 118	II	5,20	" A, B, C, D
119 - 174	III	5,56	" B, C, D, E
175 - 236	IV	7,32	" C, D, E
237 - 302	V	10,98	" D, E, F
303 - 320	VI	1,88	" E, F

4. Isolierung von Solayamocinosid A

1,74 g der dunkelbraunen Teilfraktion I wurden sc an 180 g Aluminiumoxid neutral (WOELM), Aktivitätsstufe V, mit Chloroform/Methanol/Wasser (65v/35v/10v) weiter aufgetrennt. Hiernach fielen 250 mg einer Solayamocinosid A - haltigen Fraktion an, die daneben nur noch das entsprechende Spirostanolglykosid

(Solayamocin A) enthielt. Durch präparative DC mit zweimaliger Entwicklung in n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) wurden hieraus 170 mg farbloses bis schwach gelbliches, in verschiedenen Systemen dc einheitliches Solayamocinosid A gewonnen. Weiteres Solayamocinosid A wurde aus der Teilfraktion II isoliert. 2,60 g dieser Fraktion wurden an 410 g Kieselgel 60/ Kieselgur (7 : 2) mit Methylenchlorid/Methanol (8v/2v) aufgetrennt. Es wurden 180 Fraktionen zu 20 ml aufgefangen. Die Fraktion 21 - 135 (1,19 g) enthielt ausschließlich Furo- und Spirostanolglykosid A. Sie wurde erneut an 150 g Kieselgel 60 mit n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) gesäult. Es wurden 130 Fraktionen zu 15 ml erhalten, von denen die Fraktion 32 - 106 neben Spuren UV - absorbierender Substanzen nur Solayamocinosid A enthielt. Der Rückstand dieser Fraktion (600 mg) wurde zum Nachweis der Furostanolstruktur eingesetzt.

5. Isolierung von Solayamocinosid C

Die Solayamocinosid C - haltigen Teilfraktionen II, III und IV wurden halbiert und jeweils an der 100-fachen Menge Kieselgel 60 sc mit n-Butanol/Methanol (9v/1v) aufgetrennt. Die hierbei anfallenden Fraktionen der 3 Säulen wurden vereinigt (562 mg) und an der 250-fachen Menge Kieselgel 60 mit Chloroform/Methanol/Wasser (65v/35v/10v) gesäult. Hierbei wurden 170 mg eines Gemisches aus Furo- und Spirostanolglykosid C erhalten. Die Fraktion wurde in 0,5 ml 0,o1n wässriger HCl 30 Min. lang am Rückfluß erhitzt. Nach Neutralisation mit äthanolischer KOH und Filtration der trüben Lösung durch eine

Filterspritze (vgl. DIBBERN und Mitarb., 1971) war im DC nur noch Solayamocin C nachweisbar. Der Filterrückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und in dieser Lösung Glucose identifiziert.

Die Totalhydrolyse, Partialhydrolysen, enzymatische Hydrolyse und Permethylierungsanalysen erfolgten analog den Angaben bei Solayamocinosid A bzw. Solayamocin A (s. S. 133 f).

6. Isolierung der Solayamocine B, D, E und F

6.1. Isolierung von Solayamocinosid B und Solayamocin B

Bei der Isolierung der Solayamocinoside A und C waren bei den sc Trennungen Fraktionen angefallen, in denen Solayamocinosid B und Solayamocin B angereichert vorlagen. Diese Fraktionen wurden vereinigt (130 mg) und an 15 g Kieselgel 60 mit Chloroform/Methanol (94v/6v) sc weiter gereinigt. Hiernach fielen 31 mg einer Fraktion an, die ausschließlich Solayamocinosid B und Solayamocin B enthielt. Die beiden Glykoside wurden durch präparative Schichtchromatographie im System n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) getrennt (hR_f 36 bzw. 38). Danach lagen 12 mg Solayamocinosid B und 10 mg Solayamocin B dc rein vor.

6.2. Isolierung von Solayamocin D und E

Bei der Isolierung von Solayamocinosid C aus den Teilfraktionen III und IV waren insgesamt 80 mg von Unterfraktionen angefallen, die die Furo- und Spirostanolglykoside D und E enthielten. Die beiden Glykosidpaare wurden durch präparative DC an 8 Aluminiumfolien (Kieselgel) mit n-Butanol/Äthanol/Wasser

(5v/1v/1v) aufgetrennt (32 bzw. 24 mg). In beiden Fraktionen wurde, wie auf S. 133 beschrieben, das Furostanolglykosid partialhydrolytisch in das entsprechende Spirostanolglykosid überführt. Im Hydrolysat wurde jeweils Glucose dc und gc nachgewiesen. Es wurden 5,2 mg Solayamocin D und 3,1 mg Solayamocin E dc rein erhalten.
Weitere Mengen fielen aus der Teilfraktion V bei der Isolierung von Solayamocin F an.

6.3. Isolierung von Solayamocin F

5,49 g der Teilfraktion V wurden an 500 g Kieselgel 60 mit je 500 ml Chloroform, Aceton, n-Butanol/Äthanol (1v/1v), Äthanol und Methanol eluiert. Nach Abtrennung von 1,02 g einer Saponin D - haltigen Fraktion resultierten 2,46 g einer Fraktion, die die Glykosidpaare E und F enthielt. Nach Vereinigung mit der Teilfraktion VI (0,94 g) wurde das Substanzgemisch an 200 g Kieselgel 60 mit Chloroform/Methanol/Wasser (65v/30v/10v) weiter getrennt. Es wurden 630 mg einer mit den Saponinen E und F angereicherten Fraktion sowie 100 mg einer Fraktion mit Saponin F erhalten. Das Furostanolglykosid F in der Saponin F - Fraktion wurde partialhydrolytisch in das Spirostanolglykosid F umgelagert (s. S. 133) und dabei Glucose identifiziert. Danach lagen 80 mg Solayamocin F dc einheitlich vor.

XI. Oxidativer Abbau von Solayamocinosid A

1. Peracetylierung und Dehydratisierung

600 mg Solayamocinosid A wurden mit 15 ml Essigsäureanhydrid in 30 ml Pyridin (TOMOWA u. GJULEMETOWA, 1978) 22 Std. lang

bei Raumtemperatur unter Rühren acetyliert (TSCHESCHE und Mitarb., 1969a). Der Trockenrückstand wurde mit 60 ml Eisessig versetzt und 2 Std. lang auf 120°C unter Rückfluß erhitzt (TOMOWA u. GJULEMETOWA, 1978). Danach wurde der Eisessig im Vakuum zunächst bei 70°C, dann bei 90°C abdestilliert und die verbleibende Essigsäure mit Benzol und Toluol azeotrop entfernt (TSCHESCHE und Mitarb., 1969a). Es wurden 670 mg peracetyliertes $\Delta^{20,22}$- Produkt erhalten.

2. Chromsäure - Abbau

Bei der weiteren Aufarbeitung wurden die experimentellen Angaben von TOMOWA u. GJULEMETOWA (1978) befolgt.
670 mg Peracetylglykosid wurde 1 Std. lang mit 0,36 g CrO_3 und 0,18 g Natriumacetat in 60 ml 85 %-iger Essigsäure bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde mit 600 ml 50 %-igem Methanol verdünnt, nach 90 Min. mit Chloroform extrahiert und die Chloroformphasen eingedampft. Das erhaltene Esterketon wurde in 18 ml tert.-Butanol mit 0,90 g KOH in 3 ml Wasser 3 Std. lang bei Raumtemperatur hydrolysiert. Nach Abdestillieren des tert.-Butanols und Zusatz von Wasser erfolgte eine intensive Extraktion mit n-Butanol. In der Butanolphase fällt das $\Delta^{5,16}$-Pregnadien-3β-ol-20-on-glykosid an, in der wässrigen Phase das γ-Methyl-δ-hydroxy-valeriansäureglucosid (s. Abb. 19, S. 57).

2. 1. Hydrolyse des $\Delta^{5,16}$- Pregnadien-3β-ol-20-on-glykosides

Die Butanolphase ergab nach dem Eindampfen im Vakuum einen Rückstand, aus dem mit heißem Methanol 498,7 mg einer $\Delta^{5,16}$-

Pregnadien-3β-ol-20-on-glykosid - haltigen Fraktion herausgelöst wurde. 240 mg dieser Rohglykosidfraktion wurden in 24 ml 2n HCl und 90 ml Benzol 3 Std. lang bei 80°C hydrolysiert. Dann wurde das Hydrolysat etwas eingeengt, Wasser hinzugefügt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit Silbercarbonat neutralisiert. In ihr wurden dc Rhamnose, Arabinose und Galactose nachgewiesen.

Die Benzol - Chloroform - Phase wurde zur Trockne gebracht und in wenig heißem Methanol gelöst. Beim Abkühlen kristallisierte eine gelbliche Substanz aus, die durch präparative DC in Benzol/Aceton (97v/3v) gereinigt wurde (hR_f = 13; Detektion: Cer(IV)-sulfat). Danach lagen 6,4 mg kristallines $\Delta^{5,16}$- Pregnadien-3β-ol-20-on vor, das durch DC - Analyse, Schmp., Mischschmp., UV - und IR - Spektrum mit Hilfe authentischer Vergleichssubstanz identifiziert wurde. R_f - Wert im System Chloroform/Methanol/Wasser (7v/2v/0,1v) = 0,70 (s. auch TOMOWA u. GJULEMETOWA, 1978). Schmp. 201 - 203 °C, Mischschmp. ohne Depression. UV - Spektrum in Äthanol abs.: λ_{max} = 267 nm, ε = 8930; IR - Spektrum identisch mit der Vergleichssubstanz: 1735, 1655, 1650, 1582, 1448, 1372, 979, 962, 908, 883, 819 cm^{-1}.

Die Vergleichssubstanz wurde durch Entacetylierung von 3β-Acetoxy-$\Delta^{5,16}$-pregnadien-3β-ol-20-on gewonnen. 5 mg dieser Verbindung wurden mit 4 ml methanolischem Ammoniak (wasserfreies Methanol bei - 10°C mit NH_3 gesättigt) 10 Std. lang bei Raumtemperatur gerührt (TSCHESCHE und Mitarb., 1969a). Das entstandene Hauptprodukt hatte in Benzol/Aceton (97v/3v) wie die isolierte Substanz einen hR_f - Wert von 13 und wurde durch

präparative DC isoliert.

2.2. Acetylierung des isolierten $\Delta^{5,16}$- Pregnadien-3β-ol-20-ons

5 mg des Pregnenolons wurden acetyliert und mit authentischer Substanz verglichen. Schmp. beider Substanzen: 173 - 175°C, Mischschmelzpunkt ohne Depression; UV - und IR - Spektren identisch. UV - Spektrum in Äthanol abs.: λ_{max} = 269 nm, ε = 9989; IR (KBr): 1735, 1660, 1593, 958, 920, 893, 820 cm^{-1}.

2.3. γ-Methyl-δ-hydroxy-valeriansäureglucosid

Das Valeriansäurederivat wurde nach Ansäuerung der wässrigen Phase mit HCl auf pH 3 mit n-Butanol und Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wurde mit 2n NaOH neutralisiert und zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit Chloroform/Methanol (1v/1v) ausgezogen und abgetrennt, die organischen Phasen eingedampft: 1,2 g.

Hiervon wurden 830 mg acetyliert und nachfolgend nach TSCHESCHE und Mitarb. (1969a) in 12 ml Methanol mit 80 ml Diazomethanlösung (3 % in Diäthyläther) methyliert. Überschüssiges Diazomethan wurde nach 10 Min. mit 2 ml Eisessig zerstört. Nach Einengen der Lösung wurden 852 mg eines rötlich braunen Sirups erhalten, aus dem durch sc Trennung an 40 g Kieselgel mit Petroläther (80-100°C)/Aceton (5v/1,7v) 37,0 mg Methylester als farblose, hochviskose Masse eluiert wurden.

Massenspektrum: m/e für Tetraacetylglucose: 331, 243, 242, 200, 169, 115; m/e für Säureanteil: 129, 97 (Auflösung 9500).

Der restliche Teil des Säureglucosides (370 mg) wurde mit β-

Glucosidase (s. XII.2.) behandelt. Glucose wurde im DC und als Alditolacetat gc nachgewiesen.
Die wässrige Phase wurde mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherphase ergab 3,9 mg eines farblosen Öls, das durch optische Drehung und massenspektrometrisch als (γS)-γ-Methyl-δ-valerolacton identifiziert wurde. $[\alpha]_D^{20} = -9{,}1^\circ$ ($CHCl_3$, c = 0,404). Massenspektrum: m/e = 114, 84, 70, 57, 55, 43, 41.

XII. Hydrolytische Maßnahmen zur Strukturaufklärung der Zuckerkette von Solayamocinosid A

1. Abspaltung der Glucose von C-26 mit verdünnter Säure

35,4 mg Solayamocinosid A wurden in 30 ml 0,01n wässriger HCl gelöst und 30 Min. lang am Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde mit schwach basischem Ionenaustauscher (MERCK) neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingeengt. Nach Zusatz von 10 ml Wasser wurde 10 mal mit je 10 ml n-Butanol ausgeschüttelt. Es wurden 27 mg Solayamocin A erhalten. In der eingeengten wässrigen Phase wurde dc und gc nur Glucose nachgewiesen.

2. Enzymatische Abspaltung der Glucose von C-26

Die enzymatischen Spaltungen wurden in Anlehnung an TSCHESCHE u. GUTWINSKI (1975) durchgeführt. Als Enzym wurde β-Glucosidase aus Süßmandeln (Fa. BOEHRINGER, Mannheim; Fa. PAESEL, Frankfurt) verwendet.
72 mg Solayamocinosid A wurden in 5 ml Wasser gelöst und mit 0,5 ml einer 0,5 %-igen Enzymsuspension in 2,2m $(NH_4)_2SO_4$ versetzt und die Mischung bei 39°C aufbewahrt. Die Spaltung wurde

dc im System n-Butanol/Äthanol/Wasser (5v/1v/1v) verfolgt. Nach 2 Tagen war sie vollständig abgelaufen. Nach Zusatz von 2 ml Methanol und Erwärmen der Suspension auf 70°C wurde filtriert, mit wenig n-Butanol nachgewaschen und 10 mal mit je 10 ml n-Butanol ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde im Vakuum eingeengt. In ihr wurde Glucose dc und als Alditolacetat gc nachgewiesen. Die Butanolphase wurde im Vakuum zur Trockne gebracht. Es fielen 58 mg einer Fraktion an, die dc ausschließlich Spirostanolglykosid A enthielt.

3. Totalhydrolyse von Solayamocin A

17 mg Solayamocin A wurden mit 5 ml 2n wässriger HCl 4 Std. lang am Rückfluß hydrolysiert. Die Lösung wurde mit 10 ml Wasser versetzt, auf die Hälfte des Volumens eingeengt, mit ca. 8 g stark basischem Ionenaustauscher (MERCK) neutralisiert und filtriert. Nach dem Nachwaschen mit wenig Wasser wurde die wässrige Phase 10 mal mit je 10 ml Chloroform ausgeschüttelt; das Reaktionsgefäß mit Chloroform gespült und die Lösung über den Ionenaustauscher filtriert. Nach dem Nachwaschen des Filters mit 3 mal 5 ml Chloroform wurde die vereinigte organische Phase eingeengt und in ihr Yamogenin, wie auf S. 24 beschrieben, identifiziert. Die wässrige Phase wurde auf ca. 1 ml eingeengt und in den Fließmittelsystemen zur Zuckertrennung (s. S. 107) dc untersucht.
Anschließend wurde die wässrige Phase mit 80 mg Natriumborhydrid versetzt und, wie auf S. 112 beschrieben, die Alditolacetate hergestellt. Das Reaktionsgemisch wurde ohne weitere

Aufarbeitung direkt gc in dem auf S. 108 beschriebenen System analysiert.

4. Partialhydrolyse von Solayamocin A

35 mg Solayamocin A wurden in 10 ml 0,3n methanolischer HCl (5 ml 0,6n HCl + 5 ml Methanol) 60 Min. lang am Rückfluß hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde im Vakuum eingeengt, mit 5 ml Wasser versetzt und 10 mal mit jeweils 10 ml n-Butanol ausgeschüttelt. Die eingeengte Butanolausschüttelung wurde dc analysiert.
Die wässrige Phase wurde durch Schütteln mit ca. 3 g stark basischem Ionenaustauscher neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingeengt. Die Zucker wurden dc sowie gc als Arabinose und Galactose identifiziert.
Bei weiteren Partialhydrolysen wurde analog verfahren.

5. Enzymatische Abspaltung der Galactose von Solayamocin A

10 mg Solayamocin A wurden in 2 ml Wasser gelöst und mit 0,1 ml einer 0,5 %-igen Suspension von β-Galactosidase aus Escherichia coli (BOEHRINGER) in 2,2m $(NH_4)_2SO_4$ - Lösung versetzt. Die Mischung wurde bei 39°C aufbewahrt und das verkürzte Glykosid, wie bei XII.2. (S. 134) beschrieben, durch Ausschütteln mit n-Butanol gewonnen.

6. Hydrolyse des permethylierten Solayamocin A

12 mg Solayamocin A wurden, wie auf S. 111 angegeben, permethyliert und das Glykosid danach nach WALLENFELS und Mitarb. (1963) 40 Std. lang in 2 %-iger methanolischer HCl bei 70°C

am Rückfluß hydrolysiert. Neutralisiert wurde mit Bariumcarbonat, wobei kleine Tröpfchen an pH - Papier geprüft wurden. In die Lösung wurde Stickstoff geleitet, um Acidifizierung durch CO_2 zu vermeiden. Nach Filtration der Lösung wurden, wie auf S. 112 beschrieben, die Alditolacetate der Methylzucker hergestellt. Die partiell methylierten Alditolacetate wurden durch GC - und GC - MS - Analyse identifiziert. Von 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactitol und Penta-O-acetyl-rhamnitol wurde darüber hinaus das Molekülion durch das Massenspektrum nach chemischer Ionisierung bestimmt (s. Abb. 39 und Abb. 40). Bei weiteren durchgeführten Methylierungsanalysen wurde entsprechend verfahren.

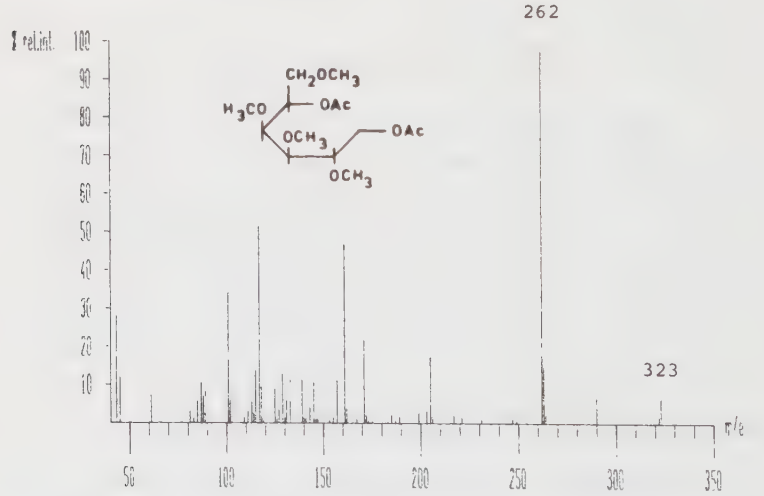


Abbildung 39: Massenspektrum nach chemischer Ionisierung (CH_4) von 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactitol ($M^+ + 1$: m/e = 323; Basispeak: m/e = 262 (M^+ - Essigsäure))

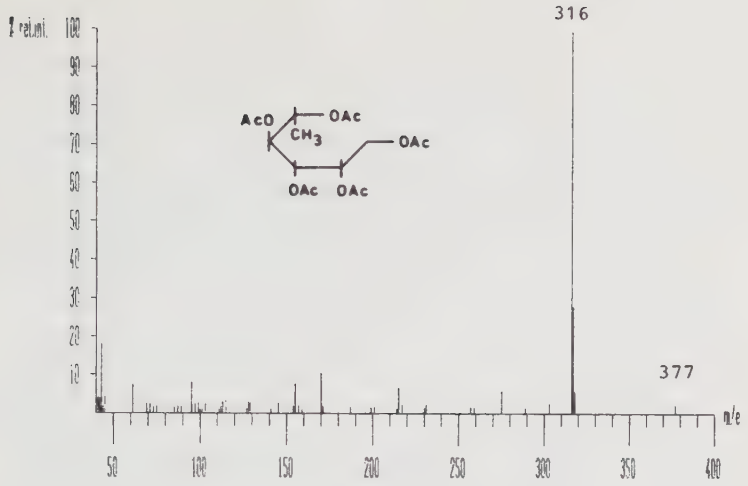


Abbildung 40: Massenspektrum nach chemischer Ionisierung (CH_4) von Penta-O-acetylrhamnitol (M^+ + 1: m/e = 377; Basispeak: m/e = 316 (M^+ - Essigsäure))

XIII. Nachweis der hämolytischen Aktivität

4,5 g Gelatine wurden in 100 ml 0,9 %-ige NaCl - Lösung gegeben und 30 Min. später bis auf 80°C erwärmt. Nach Kühlung der Lösung wurden 6 ml defibriniertes Rinderblut dazugefügt und gründlich gemischt (SMOCZKIEWICZ und Mitarb., 1977). Die entwickelten und getrockneten DC - Platten wurden mit der Blutgelatinelösung durch langsames Gießen überschichtet. Das Volumen der hergestellten Blutgelatinelösung reicht für 2 DC _ Platten der Größe 20 x 20 cm. Die Saponine geben sich durch weiße Hämolyseflecke zu erkennen.

G. Literaturverzeichnis *

ABAIDULLAEV, K.A., R. SHAKIROV u. S.Y. YUNUSOV: Alkaloids from Veratrum lobelianum; Khim. Prir. Soedin. 10, 678-679 (1974)

ABOU-ZIED, E.N., S.A. EL-SHAFIE u. M. ABOU-SEKKINA: Seasonal changes in Solasodine and carbohydrate percentages in the upper and lower leaves (single harvest) during the life cycle of Solanum laciniatum AIT.; Pharmazie 33, 676-677 (1978)

ADAM, G., H.Th. HUONG u. N.H. KHOI: The constituents of the vietnamese plant drug Solanum verbascifolium L.; Planta Med. 36, 238-239 (1979)

ADAM, G., K. SCHREIBER, J. TOMKO u. A. VASSOVA: Verazin, ein neues Veratrum Alkaloid mit 22,26-Imino-cholestan-gerüst; Tetrahedron 23, 167-171 (1967)

ALKEMEYER, M.: Untersuchungen über die Glykoalkaloide von Solanum dulcamara L.; Dissertation Berlin, 1959

ALKEMEYER, M. u. H. SANDER: Ein Glykoalkaloid aus Solanum dulcamara L.; Naturwissenschaften 46, 207-208 (1959)

BARRETT, C.B., M.S.J. DALLAS u. F.B. PADLEY: The separation of glycerides by thin-layer chromatography on silica impregnated with silver nitrate; Chem. Ind. 1050-1051 (1962)

BECKEY, H.D.: Field desorption mass spectrometry: a technique for the study of thermally unstable substances of low volatility; Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 2, 500-503 (1969)

BENNETT, R.D. u. E. HEFTMANN: Biosynthesis of Dioscorea Sapogenins from Cholesterol; Phytochemistry 4, 577-586 (1965)

---

* Die Abkürzungen der Fachzeitschriften erfolgten nach den Angaben des Chemical Abstracts Service Source Index

BENNETT, R.D., E. HEFTMANN u. R.A. JOLY: Biosynthesis of Diosgenin from 26-Hydroxy-cholesterol in Dioscorea floribunda; Phytochemistry 9, 349-353 (1970)

BENNETT, R.D., S.T. KO u. E. HEFTMANN: Isolation of Estrone and Cholesterol from the Date Palm, Phoenix dactylifera L.; Phytochemistry 5, 231-235 (1966)

BENNETT, R.D., E.R. LIEBER u. E. HEFTMANN: Biosynthesis of Neotigogenin and Δ^{16}-5α-Pregnen-3β-ol-20-one from Cholesterol in Lycopersicon pimpinellifolium; Phytochemistry 6, 837-840 (1967)

BHATTACHARYA, S.K., A.K. PARIKH, N.C. NEOGY, R. LAL, P.K. DEBNATH u. V.B. PANDEY: Investigations on the anti-inflammatory and anti-arthritic activities of saponins isolated from Costus speciosus; Rheumatism 6, 1 (1971)

BIEMANN, K., D.C. DE JONGH u. H.K. SCHNOES: Application of Mass Spectrometry to structure problems XIII. Acetates of Pentoses and Hexoses; J. Am. Chem. Soc. 85, 1763-1771 (1963)

BIRD, G.J., D.J. COLLINS, F.W. EASTWOOD u. J.M. SWAN: Structures of the steroidal alkaloids 25-Isosolafloridine and Solacallinidine isolated from Solanum callium; Aust. J. Chem. 32, 597-609 (1979)

BJÖRNDAL, H., B. LINDBERG u. S. SVENSSON: Mass Spectrometry of partially methylated alditol acetates; Carbohydr. Res. 5, 443-440 (1967)

BJÖRNDAL, H., A. PILOTTI, B. LINDBERG u. S. SVENSSON: Mass spectra of partially methylated alditolacetates II. Deuterium labelling experiments; Carbohydr. Res. 15, 339-349 (1970)

BLUNDEN, G., C. CULLING u. K. JEWERS: Steroidal sapogenins: a review of actual and potential plant sources; Trop. Sci. 17, 139-154 (1975)

BOGACHEVA, N.G., V.P. KISELEV u. L.M. KOGAN: Isolation of 3,26-Bisglycoside of Yamogenin from Trigonella foenum-graecum; Khim. Prir. Soedin. 2, 268-269 (1976)

BOGNAR, R. u. S. MAKLEIT: Steroidalkaloidglykoside 8. Mitt. Zusammenfassung der eigenen bisherigen Untersuchungsergebnisse über das Vorkommen von Steroidalkaloidglykosiden in Pflanzen der Gattung Solanum; Pharmazie 20, 40-42 (1965)

BOLL, P.M.: Alkaloidal glycosides from Solanum dulcamara II. Three new glycosides and a reassessment of Soladulcamaridine; Acta Chem. Scand. 16, 1819-1830 (1962)

BOLL, P.M. u. B. ANDERSEN: Alkaloidal glycosides from Solanum dulcamara III. Differentiation of geographical strains by means of thin layer-chromatography; Planta Med. 10, 421-432 (1962)

BORÉN, H.B., P.J. GAREGG, B. LINDBERG u. S. SVENSSON: Mass spectra of partially methylated alditol acetates III. Labelling experiments in the Mass Spectrometry of partially methylated deoxyalditol acetates; Acta Chem. Scand. 25, 3299-3308 (1971)

BRAUN, H.: Heilpflanzen - Lexikon für Ärzte und Apotheker 3. Aufl. G. Fischer Verlag Stuttgart, New York 1978

BRIGGS, L.H., W.E. HARVEY, R.H. LOCKER, W.A. Mc GILLIVRAY u. R.N. SEELYE: Solanum Alkaloids V. Solasodine; J. Chem. Soc. 3013-3020 (1950)

CANONICA, L., F. RONCHETTI u. G. RUSSO: Incorporation of 5α-Furostan-3β,26-diol into Tigogenin by Digitalis lanata; Phytochemistry 11, 243-244 (1972)

CARLE, R., A.W. ALFERMANN u. E. REINHARD: Diosgenin from Solanum aurantiacobaccatum DE WILD; Planta Med. 32, 195-196 (1977)

CHAUDHURI, A.C., Y. HARADA, K. SHIMIZU, M. GUT u. R.I. DORFMAN: Biosynthesis of Pregnenolone from 22-Hydroxycholesterol; J. Biol. Chem. 237, 703-704 (1962)

CLARKE, E.G.C.: Identification of Solanine; Nature 181, 1152-1153 (1958)

DAWIDAR, A.M., A.A. SALEH u. S.L. ELMOTEI: Steroid sapogenin constituents of Foenugreek seeds; Planta Med. 24, 367-370 (1973)

DERSCH, G. u. H. SANDER: Über Solanum dulcamara L. 6. Mitt. Cytologische Untersuchung chemisch verschiedener Sippen; Pharm. Ztg. 107, 1540-1541 (1962)

DIBBERN, H.W., D. OTT u. E. WIRBITZKI: Quantitative Dünnschichtchromatographie mit einfachen Mitteln; Dtsch. Apoth. Ztg. 111, 1649-1651 (1971)

DRAGALIN, I.P. u. P.K. KINTYA: Steroidal saponins of Yucca filamentosa: Yuccoside C and Protoyuccoside C; Phytochemistry 14, 1817-1820 (1975)

EVANS, F.J. u. P.S. COWLEY: Cardenolides and spirostanols in Digitalis purpurea at various stages of development; Phytochemistry 11, 2971-2975 (1972)

FIESER, L. u. M. FIESER: Steroide; Verlag Chemie Weinheim 1961

GESSNER, O. u. G. ORZECHOWSKI: Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa 3. Aufl. C. Winter Universitätsverlag Heidelberg 1974

GORYANU, G.M. u. P.K. KINTYA: Steroid glycosides from Asparagus officinalis Asparagosides F and H; Khim. Prir. Soedin. 6, 810-813 (1976a)

GORYANU, G.M. u. P.K.KINTYA: Steroid saponins XVII. The structure of Asparagosides D and G; Khim. Prir. Soedin. 6, 762-765 (1976b)

GORYANU, G.M., V.V. KROKHMALYUK u. P.K. KINTYA: Steroid glycosides XVI. The structures of Asparagosides C and E from Asparagus officinalis; Khim. Prir. Soedin. 6, 823-824 (1976)

GUPTA, A.S. u. S. DEV: Chromatograpy of organic compounds I. Thin layer chromatography of olefins; J. Chromatog. 12, 189-195 (1963)

HAKOMORI, S.: A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in Dimethylsulfoxide; J. Biochem. 55, 205-207 (1964)

HEACOCK, R.A. u. M.E. MAHON: The colour reactions of the Hydroxyscatoles; J. Chromatog. 17, 338-348 (1965)

HEFTMANN, E.: Biosynthesis of plant steroids; Lloydia 31, 293-317 (1968)

HEFTMANN, E.: Steroid Biochemistry; Academic Press New York 1970

HEFTMANN, E., E.R. LIEBER u. R.D. BENNETT: Biosynthesis of Tomatidine from Cholesterol in Lycopersicon pimpinellifolium; Phytochemistry 6, 225-229 (1967)

HEFTMANN, E. u. S. SCHWIMMER: Degradation of Tomatine to 3β-Hydroxy-5α-pregn-16-en-20-one by ripe tomatoes; Phytochemistry 11, 2783-2787 (1972)

HEGI, G.: Illustrierte Flora von Mittel-Europa Bd. V, 4. Teil, 2589 München 1927

HEYNS, K., H.F. GRÜTZMACHER, H. SCHARMANN u. D. MÜLLER: Massenspektrometrische Strukturanalysen von Kohlenhydraten; Fortschr. chem. Forsch. 5, 448-490 (1966)

HEYNS, K. u. H. SCHARMANN: Massenspektrometrische Untersuchungen II. Die Massenspektren von Derivaten der Monosaccharide und Aminozucker; Liebigs Ann. Chem. 667, 183-193 (1963)

HEYNS, K., K.R. SPERLING u. H.F. GRÜTZMACHER: Massenspektrometrische Untersuchungen XIX. Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie zur Analyse partiell methylierter Zuckerderivate. Die Massenspektren von partiell methylierten Methyl-Glucosiden; Carbohydr. Res. 9, 79-97 (1969)

HOSODA, N. u. M. YATAZAWA: Sterols, steroidal sapogenin and steroidal alkaloid in callus culture of Solanum laciniatum AIT.; Agric. Biol. Chem. 43, 821-825 (1979)

JAIN, S.C.: Steroidal sapogenins from Trigonella occulta; J. Nat. Prod. (Lloydia) 39, 244-245 (1976)

JANSSON, P.E., L. KENNE, H. LINDGREN, B. LINDBERG u. J. LÖNNGREN: A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates; Chem. Commun. 8, 1-75 (1976)

JEFFERIES, T.M. u. R. HARDMAN: The IR-Spectrometric estimation of Diosgenin and Yamogenin individually and as their mixtures; Planta Med. 22, 78-87 (1972)

JOLY, R.A., J. BONNER, R.D. BENNETT u. E. HEFTMANN: Conversion of an open-chain saponin to Dioscin by a Dioscorea floribunda homogenate; Phytochemistry 8, 1445-1447 (1969a)

JOLY, R.A., J. BONNER, R.D. BENNETT u. E. HEFTMANN: The biosynthesis of steroidal sapogenins in Dioscorea floribunda from doubly labelled cholesterol; Phytochemistry 8, 1709-1711 (1969b)

JOLY, R. u. C. TAMM: Biosynthesis of steroidal sapogenins. Incorporation and distribution of radioactivity of (2-^{14}C)- and (3-^{14}C)-Mevalonate in Tigogenin; Tetrahedron Lett. 36, 3535-3540 (1967)

KANEKO, K., H. SETO, C. MOTOKI u. H. MITSUHASHI: Biosynthesis of Rubijervine in Veratrum grandiflorum; Phytochemistry 14, 1295-1301 (1975)

KANEKO, K., M.W. TANAKA u. H. MITSUHASHI: Origin of Nitrogen in the biosynthesis of Solanidine by Veratrum grandiflorum; Phytochemistry 15, 1391-1393 (1976)

KANEKO, K., S. TERADA, N. YOSHIDA u. H. MITSUHASHI: Structure of Barogenin from Solanum tuberosum; Phytochemistry 16, 791-793 (1977)

KAWANO, K., K. SAKAI, H. SATO u. S. SAKAMURA: A bitter principle of Asparagus: Isolation and structure of Furostanol saponin in Asparagus storage root; Agric. Biol. Chem. 39, 1999-2002 (1975)

KAWANO, K., H. SATO u. S. SAKAMURA: Isolation and structure of Furostanol saponin in Asparagus edible shoots; Agric. Biol. Chem. 41, 1-8 (1977)

KAWASAKI, T., T. KOMORI, K. MIYAHARA, T. NOHARA, I. HOSOKAWA u. K. MIHASHI: Furostanol bisglycosides corresponding to Dioscin and Gracillin; Chem. Pharm. Bull. 22, 2164-2175 (1974)

KHASHIMOV, A.M., R. SHAKIROV u. S.Y. YUNUSOW: A study of the alkaloids of Veratrum lobelianum; Khim. Prir. Soedin. 6, 339-342 (1970)

KINTYA, P.K., N.E. MASHCHENKO, N.I. KONONOVA u. G.V. LAZUR'EVSKII: Steroid Saponins XII. Preliminary characterization of steroid glycosides from Funkia ovata; Khim. Prir. Soedin. 2, 267-268 (1976)

KINTYA, P.K., A.I. STAMOVA, L.B. BAKINOVSKII u. V.V. KROKHMALYUK: Steroid Glycosides XXI. The structure of Polygonatoside E' and Protopolygonatoside E' from the leaves of Polygonatum latifolium; Khim. Prir. Soedin. 3, 350-354 (1978)

KINTYA, P.K., A.I. VELEVA u. G.V. LAZUR'EVSKII: Steroid Saponins XV. Preliminary characterization of the steroid glycosides from Polygonatum latifolium; Khim. Prir. Soedin. 5, 670-671 (1976)

KIYOSAWA, S., M. HUTOH, T. KOMORI, T. NOHARA, I. HOSOKAWA u. T. KAWASAKI: Detection of Proto-type compounds of Diosgenin- and other Spirostanol-Glycosides; Chem. Pharm. Bull. 16, 1162-1164 (1968)

KÖSTENS, J.: Die Triterpenoide, Sterine und Sterinderivate von Solanum dulcamara L.; Dissertation Marburg, 1973

KROKHMALYUK, V.V. u. P.K. KINTYA: Steroid Saponins X. Glycosides of Allium narcissiflorum: The structure of Glycosides A and B; Khim. Prir. Soedin. 1, 55-58 (1976a)

KROKHMALYUK, V.V. u. P.K. KINTYA: Steroid Saponins XIII. The structure of Alliumosides D and E from Allium narcissiflorum; Khim. Prir. Soedin. 2, 184-188 (1976b)

KUHN, R., H. EGGE, R. BROSSMER, A. GAUHE, P. KLESSE, W. LOCHINGER, E. RÖHM, H. TRISCHMANN u. D. TSCHAMPEL: Über die Ganglioside des Gehirns; Angew. Chem. 72, 805-811 (1960)

KUPCHAN, S.M.: Recent advances in the chemistry of tumor inhibitors of plant origin; Trans. N. Y. Acad. Sci. 32, 85-106 (1970)

KUPCHAN, S.M., S.J. BARBOUTIS, J.R. KNOX u. C.A. LAU CAM: Beta-Solamarine: Tumor inhibitor isolated from Solanum dulcamara; Science 150, 1827-1828 (1965)

LINDGREN, B.O. u. C.M. SVAHN: Separation of Trimethylsilyl Ethers of Triterpenes by thin-layer chromatography: Triterpenes in wood from Populus tremula L.; Acta Chem. Scand. 20, 1763-1768 (1966)

v. LINNÉ, C.: Materia medica 1749

LÖNNGREN, J. u. S. SVENSSON: Mass spectrometry in structural analysis of natural carbohydrates; Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 29, 41-106 (1974)

MAHATO, S.B., N.P. SAHU u. B.C. PAL: New steroidal saponins from Dioscorea floribunda: Structures of Floribunda-saponins C, D, E and F; Ind. J. Chem. 16B, 350-354 (1978)

MAKLEIT, S. u. R. BOGNAR: Steroidalkaloidglykoside VII. Über den Δ^5-Tomatidenol-(3β)-Gehalt des Solanum dulcamara L.; Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 38, 53-54 (1963)

MAKLEIT, S., G.D. GAAL u. R. BOGNAR: Steroidalkaloidglykoside IV. Über die Untersuchung des Gehaltes an Steroid-glykoalkaloiden einiger Solanum - Arten; Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 33, 407-414 (1962)

MARKER, R.E. u. J. LOPEZ: Steroidal Sapogenins 165. Structure of sapogenin glycosides; J. Am. Chem. Soc. 69, 2389-2392 (1947)

MARKER, R.E., R.B. WAGNER, P.R. ULSHAFER, E.L. WITTBECKER, D.P.J. GOLDSMITH u. C.H. RUOF: Sterols CLVII. Sapogenins LXIX. Isolation and structures of thirteen new steroidal sapogenins. New sources for known sapogenins; J. Am. Chem. Soc. 65, 1199-1209 (1943)

MATHÉ, I.: Investigations on the variability of the alkaloid content in Solanum dulcamara L.; Herba Pol. 16, 278-285 (1970)

MATHÉ, I. u. I. MATHÉ jr.: Ökologische Untersuchungen und Gehaltsstoffprüfungen mit Solanum dulcamara L.; Herba Hung. 9, 7-16 (1970)

MATHÉ, I. u. I. MATHÉ jr.: Zur Variabilität von Solanum dulcamara L.; Bot. Közl. 59, 2, 129-134 (1972)

MATHÉ,I. u. I. MATHÉ jr.: Data to the european area of the chemical taxa of Solanum dulcamara L.; Acta Bot. Acad. Sci. Hung. 19, 441-452 (1973)

MATHÉ, I. jr. u. I. MATHÉ: Steroids of Solanum dulcamara L. and their variability; Herba Hung. 1, 39-55 (1978)

MATHÉ, I. jr., Z. SZÖCS, I. PRÉCSÉNYI u. I. MATHÉ: Study of the shoot production (Phytomass and Alkaloid) of Solanum dulcamara L. in Hungary; Herba Hung. 16, 37-43 (1977)

NOHARA, T., H. YABUTA, M. SUENOBU, R. HIDA, K. MIYAHARA u. T. KAWASAKI: Steroid glycosides in Paris polyphylla Sm.; Chem. Pharm. Bull. 21, 1240-1247 (1973)

OKANISHI, T. u. M. TOGAMI: Colorimetric determination of steroidal sapogenins II.; Chem. Pharm. Bull. 17, 315-319 (1969)

PANDEY, V.B., B. DASGUPTA, S.K. BHATTACHARYA, P.K. DEBNATH, S. SINGH u. A.K. SANYAL: Chemical and pharmacological investigations of saponins of Costus speciosus; Ind. J. Pharm. 34, 116-119 (1972)

PARIKH, A.K., S.K. BHATTACHARYA, N.C. NEOGY, R. LAL u. P.K. DEBNATH: Studies on the antiinflammatory activity of Costus speciosus; Ind. J. Pharm. 32, 177-181 (1970)

PATT, P. u. W. WINKLER: Zur Darstellung und Bestimmung von Solanin durch Ionenaustausch; Arch. Pharm. 293, 846-853 (1960)

PETRE, R., R. DENNIS, B.P. JACKSON u. K.R. JETHWA: Thin-layer chromatography of sugars and uronic acids in plant extracts on cellulose; Planta Med. 21, 81-83 (1976)

PROKOSHEV, S.M., E.I. PETROCHENKO u. V.Z. BARANOVA: Variability of Tomatin content in tomato leaves; Dokl. Akad. Nauk. SSSR 83, 261-264 (1952)

RASMUSSEN, H.B. u. P.M. BOLL: Alkaloidal glycosides from Solanum dulcamara I. Soladulcamarine, the alkaloidal glycoside of Solanum dulcamara L.; Acta Chem. Scand. 12, 802-806 (1958)

RAVIKUMAR, P.R., P. HAMMESFAHR u. C.S. SIH: Cytotoxic saponins from the chinese herbal drug Yunnan Bai Yao; J. Pharm. Sci. 68, 900-903 (1979)

RÖNSCH, H. u. K. SCHREIBER: Solanum Alkaloide LXV. Über vier neue 15α-Hydroxy-spirosolan - Alkaloide aus Wurzeln von Solanum dulcamara L.; Liebigs Ann. Chem. 694, 169-182 (1966a)

RÖNSCH, H. u. K. SCHREIBER: Solanum Alkaloide LXXII. Über γ_1- und δ-Solamarin, zwei neue Tomatidenolglykoside aus Solanum dulcamara L.; Phytochemistry 5, 1227-1233 (1966b)

RÖNSCH, H. u. K. SCHREIBER: Solanum Alkaloide LXXXIII. Analytische und präparative dünnschichtchromatographische Trennung von 5α-gesättigten bzw. Δ^5-ungesättigten Steroidalkaloiden und -sapogeninen an silbernitrathaltigen Adsorptionsschichten; J. Chromatog. 30, 149-154 (1967)

RÖNSCH, H., K. SCHREIBER u. H. STUBBE: Isolierung von Tomatidin aus Bittersüßem Nachtschatten; Naturwissenschaften 55, 182 (1968)

RONCHETTI, F., G. RUSSO, G. FERRARA u. G. VECCHIO: The role of (25S)-5α-Cholestan-3β,26-diol and (25S)-5α-Furostan-3β,26-diol in the biosynthesis of Tomatidine and Neotigogenine; Phytochemistry 14, 2423-2425 (1975)

ROZANSKI, A.: A simplified method of extraction of Diosgenin from Dioscorea tubers and its determination by gas-liquid-chromatography; Analyst 97, 968-972 (1972)

SANCHEZ, G.L., J.C.M. ACEVEDO u. R.R. SOTO: Spectrophotometric determination of Diosgenin in Dioscorea composita following thin-layer chromatography; Analyst 97, 973-976 (1972)

SANDER, H.: Studien über Bildung und Abbau von Tomatin in der Tomatenpflanze; Planta 47, 374-400 (1956)

SANDER, H.: Über Solanum dulcamara L. 8. Mitt. Chemische Differenzierung innerhalb der Art Solanum dulcamara L.; Planta Med. 11, 303-316 (1963a)

SANDER, H.: Über Solanum dulcamara L. 7. Mitt. Abbau von Spirosolanolglykosiden in reifenden Früchten; Planta Med. 11, 23-36 (1963b)

SANDER, H., M. ALKEMEYER u. R. HÄNSEL: Über Solanum dulcamara L. 4. Mitt. Chemische Differenzierung innerhalb der Art und Isolierung von Soladulcidin-tetraosid; Arch. Pharm. 295, 6-12 (1962)

SANDER, H. u. G. WILLUHN: Über Solanum dulcamara L. 5. Mitt. Isolierung von Tigogenin neben Soladulcidin aus reproduktiven Organen; Flora 151, 150-154 (1961)

SATO, H. u. S. SAKAMURA: A bitter principle of tomato seeds. Isolation and structure of a new Furostanol saponin; Agric. Biol. Chem. 37, 225-231 (1973)

SATO, Y., Y. SATO, H. KANEKO, E. BIANCHI u. H. KATAOKA: Alkaloids from Solanum congestiflorum; J. Org. Chem. 34, 1577-1582 (1969)

SCHMIDT u. SALLER: Lehrbuch der homöopathischen Arzneimittel; K.F. Haug Verlag Ulm 1952

SCHRATZ, E.: Die Bedeutung neuerer Auffassungen des Artbegriffes für die Pharmakognosie; Planta Med. 8, 282-296 (1960)

SCHRATZ, E.: Arzneipflanzen; Handbuch d. Pflanzenzüchtung V, 383-474. Hrsg. KAPPERT, H. u. W. RUDORF; P. Parey Verlag Berlin, Hamburg 2. Aufl. 1961

SCHRATZ, E.: Die physiologischen Gründe der chemischen Variabilität; Planta Med. 11, 278-286 (1963)

SCHREIBER, K.: Über einige Inhaltsstoffe der Solanaceen und ihre Bedeutung für die Kartoffelkäferresistenz; Ent. Exp. Appl. 1, 28-37 (1958)

SCHREIBER, K.: Steroid Alkaloids: The Solanum group; in R.H.F. MANSKE (Hrsg.): The Alkaloids, Chemistry and Physiology X Academic Press New York, London 1968

SCHREIBER, K., U. HAMMER, E. ITHAL, H. RIPPERGER, W. RUDOLPH u. A. WEISSENBORN: Über das Alkaloidvorkommen verschiedener Solanum - Arten; Tagungsber. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin 27, 47-73 (1961)

SCHREIBER , K. u. H. RIPPERGER: Jurubine, a novel type of steroidal saponin with (25S)-3β-Amino-5α-furostane-22α,26-diol-O(26)-β-D-glucopyranoside structure from Solanum paniculatum L.; Tetrahedron Lett., 5997-6002 (1966)

SCHREIBER, K. u. H. RÖNSCH: Neuere Untersuchungen zur Chemie und Biochemie der Alkaloide von Solanum dulcamara L.; Vortrag 2. Arbeitstag. Biochem. Physiol. d. Alkaloide, Halle 1960

SCHREIBER, K. u. H. RÖNSCH: Solanum Alkaloide XI. Mitt. Neuere Untersuchungen zur Chemie und Biochemie der Alkaloide von Solanum dulcamara L.; Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin Kl. Chem., Geol., Biol. 4, 395-406 (1963a)

SCHREIBER, K. u. H. RÖNSCH: Über Tomatid-5-en-3β-ol aus Solanum dulcamara L. und dessen Synthese; Tetrahedron Lett. 5, 329-334 (1963b)

SCHREIBER, K. u. H. RÖNSCH: Solanum Alkaloide LIII. Mitt. Die Steroidalkaloide und -sapogenine chemisch unterschiedlicher Sippen von Solanum dulcamara L.; Arch. Pharm. 298, 285-293 (1965)

SCHULTEN, H.-R., T. KOMORI u. T. KAWASAKI: Field desorption mass spectrometry of natural products I: Steroid- and Triterpene saponins; Tetrahedron 33, 2595-2602 (1977)

SCHULZ, H.: Vorlesungen über Wirkung und Anwendung der deutschen Arzneipflanzen; K.F. Haug Verlag Ulm 1956

SCHWARZE, P.: Methoden zum Solaninnachweis und zur Solaninbestimmung in Kartoffelzuchtmaterial; Züchter 32, 155-160 (1962)

SHIMIZU, K., M. GUT u. R.I. DORFMAN: 20α,22ϵ-Dihydroxycholesterol, an intermediate in the biosynthesis of Pregnenolone (3β-Hydroxy-pregn-5-en-20-one) from Cholesterol; J. Biol. Chem. 237, 699-702 (1962)

SINGH, S., A.K. SANYAL, S.K. BHATTACHARYA u. V.B. PANDEY: Oestrogenic activity of saponins from Costus speciosus; Ind. J. Med. Res. 60, 287-290 (1972)

SLONEKER, J.H.: Gas-Liquid chromatography of alditol acetates; Methods Carbohydr. Chem. 6, 20-24 (1972)

SMOCZKIEWICZ, M.A., D. NITSCHKE u. T.M. STAWINSKI: Mikrobestimmung von Spuren von Saponinglykosiden in "nichtsaponinführendem" Pflanzenmaterial; Mikrochim. Acta 2, 597-605 (1977)

SOFOWORA, E.A., R. HARDMAN: Chromatographic detection and spectrophotometric determination of Diosgenin and other Δ^5-Sapogenins in crude plant extracts; Plant. Med. 26, 385-390 (1974)

STABURSVIK, A.: A steroidal glycol, 22-Hydroxy-cholesterol from Narthecium ossifragum HUDS.; Acta Chem. Scand. 7, 1220 (1953)

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1962

THIES, H. u. F.W. REUTHER: Ein Reagenz zum Nachweis von Alkaloiden auf Papierchromatogrammen; Naturwissenschaften 41, 230-231 (1954)

TÖPFER, A.: Untersuchungen zur Biosynthese verschiedener Pflanzensteroide; Dissertation Bonn, 1975

TOMITA, Y. u. A. UOMORI: Biosynthesis of sapogenins in tissue cultures of Dioscorea tokoro MAKINO; J. Chem. Soc. Chem. Commun. 284 (1971)

TOMOWA, M.: Untersuchung des Glykoalkaloidgehaltes einiger Solanum - Arten 3. Mitt. Untersuchung über Solanum dulcamara L. var. persicum WILLD.; Planta Med. 10, 450-454 (1962)

TOMOWA, M. u. R. GJULEMETOWA: Steroidsaponine und Steroidsapogenine VI. Furostanolbisglykosid aus Tribulus terrestris L.; Planta Med. 34, 188-191 (1978)

TSCHESCHE, R.: Pflanzliche Steroide mit 21 Kohlenstoffatomen; Fortschr. Chem. Org. Naturst. 24, 99-148 (1966)

TSCHESCHE, R. u. R. FRITZ: Zur Biosynthese von Steroid - Derivaten im Pflanzenreich 16. Mitt. Beiträge zur Spirostanol - Biogenese in Digitalis lanata und Spirosolanol - Biogenese in Solanum lycopersicum; Z. Naturforsch. 25b, 590-591 (1970)

TSCHESCHE, R., B. GOOSSENS u. A. TÖPFER: Zur Einführung des Stickstoffs und zum gemeinsamen Vorkommen von 25 (R)- und 25 (S)-Steroidalkaloiden in Solanaceen; Phytochemistry 15, 1387-1389 (1976)

TSCHESCHE, R. u. H. GUTWINSKI: Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette X. Capsicosid, ein bisdesmosidisches 22-Hydroxy-furostanol-glykosid aus den Samen von Capsicum annuum L.; Chem. Ber. 108, 265-272 (1975)

TSCHESCHE, R., A. HARZ u. J. PETRICIC: Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette VIII. Asperosid, ein bisdesmosidisches 22-Hydroxy-furostanol-glykosid aus Smilax aspera L.; Chem. Ber. 107, 53-61 (1974a)

TSCHESCHE, R., K.-H. HERMANN, R. LANGLAIS, B.T.TJOA u. G. WULFF: Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette VII. Convallamarosid, ein trisdesmosidisches 22-Hydroxy-furostanol-glykosid aus den Wurzeln von Convallaria majalis L.; Chem. Ber. 106, 3010-3019 (1973)

TSCHESCHE, R. u. H. HULPKE: Zur Biosynthese von Steroid - Derivaten im Pflanzenreich 3. Mitt. Spirostanol - Biogenese aus Cholesteringlucosid; Z. Naturforsch. 21B, 494-495 (1966a)

TSCHESCHE, R. u. H. HULPKE: Zur Biosynthese von Steroid - Derivaten im Pflanzenreich 4. Mitt. Biogenese von Tomatidin aus Cholesterin; Z. Naturforsch. 21B, 893-894 (1966b)

TSCHESCHE, R., H. HULPKE u. R. FRITZ: Zur Biosynthese von Steroid - Derivaten im Pflanzenreich X. Zur Spirostanol - Biogenese aus Δ^4-Cholestenon und aus anderen möglichen Vorstufen; Phytochemistry 7, 2021-2026 (1968a)

TSCHESCHE, R., A.M. JAVELLANA u. G. WULFF: Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette IX. Purpureagitosid, ein bisdesmosidisches 22-Hydroxy-furostanol-glykosid aus den Blättern von Digitalis purpurea L.; Chem. Ber. 107, 2828-2834 (1974b)

TSCHESCHE, R. u. J. LEINERT: Zur Biosynthese von Steroid - Derivaten im Pflanzenreich XVII. 16β-Hydroxycholestanol als biogenetische Vorstufe der Steroidsapogenine; Phytochemistry 12, 1619-1620 (1973)

TSCHESCHE, R., G. LÜDKE u. G. WULFF: Über Sarsaparillosid, ein Saponinderivat mit bisglykosidischer Furostanol-struktur; Tetrahedron Lett. 29, 2785-2790 (1967)

TSCHESCHE, R., G. LÜDKE u. G. WULFF: Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette II. Sarsaparillosid, ein bisdesmosidisches 22-Hydroxy-furostanol-saponin; Chem. Ber. 102, 1253-1269 (1969a)

TSCHESCHE, R. u. G. PIESTERT: Zur Biosynthese von Steroid-Derivaten im Pflanzenreich XXI. Zur Biogenese des Tigogenins in Digitalis lanata und des Solasodins in Solanum laciniatum; Phytochemistry 14, 435-438 (1975)

TSCHESCHE, R., L. SEIDEL, S.C. SHARMA u. G. WULFF: Steroid-saponine mit mehr als einer Zuckerkette VI. Über Lanatigosid und Lanagitosid, zwei bisdesmosidische 22-Hydroxy-furostanol-glykoside aus den Blättern von Digitalis lanata EHRH.; Chem. Ber. 105, 3397-3406 (1972)

TSCHESCHE, R. u. M. SPINDLER: Zur Biogenese des Aza-Oxa-Spiran-Systems der Steroidalkaloide vom Spirosolan-Typ in Solanaceen; Phytochemistry 17, 251-255 (1978)

TSCHESCHE, R., M. TAUSCHER, H.W. FEHLHABER u. G. WULFF: Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette IV. Avenacosid A, ein bisdesmosidisches Steroidsaponin aus Avena sativa; Chem. Ber. 102, 2072-2082 (1969b)

TSCHESCHE, R., B.T. TJOA, G. WULFF u. R.V. NORONHA: Steroid-saponine mit mehr als einer Zuckerkette III. Convallamarosid, ein weiteres 22-Hydroxy-furostanol-saponin; Tetrahedron Lett. 49, 5141-5144 (1968b)

TSCHESCHE, R. u. G. WULFF: Über die antimikrobielle Wirksamkeit von Saponinen; Z. Naturforsch. 20B, 543-546 (1965)

TSCHESCHE, R. u. G. WULFF: Chemie und Biologie der Saponine; Fortschr. Chem. Org. Naturst. 30, 461-606 (1973)

TSCHESCHE, R., G. WULFF u. G. BALLE: Über Saponine der Spirostanoreihe VIII. Über das gemeinsame Vorkommen von 25α- und 25β-Sapogeninen in den Saponinen von Digitalis purpurea L. und Digitalis lanata EHRH.; Tetrahedron 18, 959-967 (1962)

TUKALO, E.A. u. B.T. IVANCHENKO: Glycosidic alkaloids of Solanum dulcamara L.; Khim. Prir. Soedin. 7, 207-208 (1971)

USUBILLAGA, A., C. SEELKOPF. I.L. KARLE, J.W. DALY u. B. WITKOP: The structure of Solaphyllidine, a novel 4-Keto-steroidal alkaloid; J. Am. Chem. Soc. 92, 700-701 (1970)

VÁGUJFALVI, D., G. HELD u. P. TÉTÉNYI: Basische und neutrale Steroidsapogenine in Solanum - Arten; Arch. Pharm. 9, 812-815 (1966)

VARMA, K.R., J.A.F. WICKRAMASINGHE u. E. CASPI: Biosynthesis of plant sterols IX. The mode of oxygenation at carbon atom 26 in the formation of sapogenins from Cholesterol; J. Biol. Chem. 244, 3951 - 3957 (1969)

VERBIST, F.: Contribution a l'etude des glucoalcaloides des Solanacees indigenes; Dissertation Nantes, 1971

WAGNER, H.: Pharmazeutische Biologie 2: Drogen und ihre Inhaltsstoffe; G. Fischer Verlag Stuttgart, New York (1980)

WALDI, D.: Dünnschichtchromatographie einiger Zucker und Zuckeralkohole; J. Chromatog. 18, 417-418 (1965)

WALL, M.E., H.E. KENNEY u. E.S. ROTHMAN: Steroidal Sapogenins XXVIII. Conversion of steroidal sapogenins to Δ^{16}-20-Keto-pregnenes; J. Am. Chem. Soc. 77, 5665-5668 (1955)

WALL, M.E., S. SEROTA u. L.P. WITTNAUER: Steroidal Sapogenins XXIV. The hydrochloric acid catalyzed equilibration of 22 ,25D- and 22 -,25L-Spirostanes; J. Am. Chem. Soc. 77, 3086-3089 (1955)

WALLENFELS, K., G. BECHTLER, R. KUHN, H. TRISCHMANN u. H. EGGE: Permethylierung von oligomeren und polymeren Kohlenhydraten und quantitative Analyse der Spaltungsprodukte; Angew. Chem. 75, 1014-1022 (1963)

WILLUHN, G.: Untersuchung zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L. I. Genetische Fixierung der unterschiedlichen Steroidalkaloidführung; Planta Med. 14, 408-420 (1966a)

WILLUHN, G.: Über den Steroidalkaloidgehalt in Solanum dulcamara - Früchten verschiedener Entwicklungsstadien; Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem., Geol., Biol. 3, 97-103 (1966b)

WILLUHN, G.: Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L. II. Der Steroidgehalt in den Früchten verschiedener Entwicklungsstadien der Tomatidenol- und Soladulcidin - Sippe; Planta Med. 15, 58-73 (1967)

WILLUHN, G.: Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L. III. Der Steroidgehalt in den Früchten der Solasodin-Sippe; Planta Med. 16, 462-466 (1968)

WILLUHN, G.: Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L. IV. Zur Frage der Einwanderung von Steroidalkaloiden aus den Blättern in die Früchte; Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82, 657-663 (1969)

WILLUHN, G. u. A. KUN-ANAKE: Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L. V. Isolierung von Tomatidin aus Wurzeln der Solasodin-Sippe; Planta Med. 18, 354-360 (1970)

WILLUHN, G.: Einige Aspekte der Biosynthese und des Stoffwechsels von Steroiden in Pflanzen; Pharm. Ztg. 121, 1491-1501 (1976)

WULFF, G.: Über die quantitative Zuckerbestimmung in Glykosiden und Oligosacchariden mit Hilfe der Gaschromatographie; J. Chromatog. 18, 285-296 (1965)

ZÜRCHER, K., H. HADORN u. C. STRACK: Vereinfachte Methode zur Herstellung der Zucker-oxim-silyl-derivate für die gaschromatographische Analyse; Dtsch. Lebensm. Rundsch. 71, 393-399 (1975)

Lebenslauf

Am 3.9.1951 wurde ich als zweites Kind des Hauptlehrers Helmut Köthe und seiner Ehefrau, der Sonderschulkonrektorin Ingeborg Köthe, geb. Spieß, in Schleusingen/Thür. geboren. 1958 - 1962 besuchte ich die Volksschule in Taben Krs. Saarburg; dann das Neusprachliche Gymnasium. Im Juni 1970 bestand ich am Neusprachlichen Gymnasium in Pirmasens die Reifeprüfung. Nach der Praktikantenzeit in der Marien - Apotheke Rodalben absolvierte ich im Juni 1972 das Pharmazeutische Vorexamen und nahm im Oktober 1972 das Pharmaziestudium an der J. W. Goethe - Universität in Frankfurt/M. auf. Dort bestand ich am 17.10.1974 den ersten Abschnitt, am 26.5.1976 den zweiten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung. Am 10.8.1976 wurde mir die Approbation als Apotheker erteilt.
Im November 1976 erhielt ich am Institut für Pharmakognosie in Frankfurt/M. eine Stellung als Wissenschaftliche Hilfskraft und begann die vorliegende Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Willuhn. Im April 1977 folgte ich Herrn Prof. Dr. G. Willuhn an die Universität Düsseldorf und bin seitdem am Institut für Pharmazeutische Biologie als Wissenschaftlicher Angestellter tätig.
Seit Mai 1976 bin ich mit Apothekerin Roswitha Köthe, geb. Held, verheiratet; im April 1979 bekamen wir einen Sohn.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren Gareis, Hoffmann, Homburger, Huth, Janecke, Jüttner, Junior, Knothe, Linde, Mutschler, Oelschläger, Roesky, Schneider, Thoma, Wiesmann und Willuhn.

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen